

Mesterséges, önrendeződő szkvalén-konjugátumok és β -peptidek szerkezetvizsgálata

Doktori értekezés

Dr. Bogdán Dóra

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Mándity István, egyetemi docens

Konzulens: Dr. Gáti Tamás, címzetes egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Batta Gyula DSc., egyetemi tanár

Mazákné Dr. Kraszni Márta, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Klebovich Imre DSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tóth Gábor DSc., egyetemi tanár

Dr. Hosztafi Sándor, tudományos főmunkatárs

Budapest
2019

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés – Irodalmi összefoglaló	5
1.1. A vizsgált vegyületek szerkezeti sajátosságai	5
1.1.1. Ekdiszteroid vegyületek	5
1.1.2. Oxim típusú vegyületek szerkezeti problémái	9
1.1.3. Szkvalén-konjugátumok	13
1.1.4. β -Peptidek	18
1.1.4.1. A β -peptidek másodlagos szerkezete	19
1.1.4.2. A vizsgált vegyületeket felépítő β -aminosavak	21
1.1.4.3. Módszerek a β -peptidek konformációjának vizsgálatában	23
1.2. Szerkezetfelderítés NMR és ECD spektroszkópiával	25
1.2.1. A szerkezetmeghatározás stratégiája	25
1.2.2. NMR technikák a szerves szerkezetfelderítésben	25
1.2.3. ECD spektroszkópia a szerkezeti vizsgálatokban	30
2. Célkitűzések	31
3. Módszerek	32
3.1. NMR spektroszkópiai vizsgálatok	32
3.1.1. Mintaelőkészítés, felhasznált anyagok	32
3.1.2. NMR felvételek	32
3.1.3. NMR felvételek feldolgozása	33
3.2. ECD spektroszkópiai vizsgálatok	34
3.2.1. Mintaelőkészítés, felhasznált anyagok	34
3.2.2. ECD felvételek	34
3.2.3. ECD felvételek feldolgozása	34
4. Eredmények	35
4.1. Ekdiszteroid vegyületek és szkvalén konjugátumaik szerkezetvizsgálata	35
4.1.1. Szerkezetigazolás, teljes ^1H és ^{13}C jelhozzárendelés elkészítése	35

4.1.1.1. A szteroid molekularészek teljes ^1H és ^{13}C jelhozzárendelésének elkészítése	40
4.1.1.2. A szkvalén-linker oldalláncok teljes ^1H és ^{13}C jelhozzárendelésének elkészítése	45
4.1.2. Térszerkezet, izoméria vizsgálata	51
4.1.2.1. A szteránváz A/B gyűrűkapcsolódásának megállapítása	51
4.1.2.2. A szteránváz diasztereotóp csoportjainak vizsgálata	52
4.1.2.3. Az oximcsoport konfigurációjának megállapítása	53
4.1.3. Az önrendeződés vizsgálata	56
4.2. β -peptidek szerkezetvizsgálata	59
4.2.1. A gerincprotonok hozzárendelése	59
4.2.2. Az önrendeződés vizsgálata	66
4.2.2.1. Rendezettség igazolása NOE-térközelségek által	66
4.2.2.2. NH amid proton deutériumcseréjének követése	68
4.2.2.3. ECD vizsgálatok	72
5. Megbeszélés	73
6. Következtetések	77
7. Összefoglalás	78
8. Summary	79
9. Irodalomjegyzék	80
10. Saját publikációk jegyzéke	93
11. Köszönetnyilvánítás	94

Rövidítések jegyzéke

1D/2D = egy-/kétdimenziós

ACHC = aminociklohexánkarbonsav

CD = cirkuláris dikroizmus

COSY = correlation spectroscopy/korrelációs spektroszkópia

d = dublett

DEPTQ = distortionless enhancement by polarization transfer with retention of quaternaries

diexo-ABHEC = *diexo*-3-aminobicyclo[2.2.1]hept-5-én-2-karbonsav

diexo-AOBHEC = *diexo*-3-amino-7-oxabicyclo[2.2.1]hept-5-én-2-karbonsav

DOSY = diffusion ordered spectroscopy/diffúziókontrollált spektroszkópia

DLS = dynamic light scattering/dinamikus fényszórás

DQF = Double Quantum Filter/dupla kvantumszűrő

ECD = elektronikus cirkuláris dikroizmus

FID = free induction decay/szabad lecsengés

HMBC= heteronuclear multi-bond correlation/többkötéses heteronukleáris korreláció

HMQC = heteronuclear multiple-quantum correlation/heteronukleáris többkvantum korreláció

HPLC = high pressure/performance liquid chromatography/
nagy nyomású/nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

HSQC = heteronuclear single quantum coherence/heteronukleáris egykvantum koherencia

INEPT = insensitive nuclei enhanced by polarization transfer/érzékeny magok
felerősítése polarizáció transzfer által

m = multiplett

NMR = nuclear magnetic resonance/mágneses magrezonancia

NOE = nuclear Overhauser effect/mag Overhauser-hatás

NOESY = nuclear Overhauser effect spectroscopy/mag Overhauser-hatás
spektroszkópia

PEP = preservation of equivalent pathways

PFG-NMR = pulsed field gradient NMR/grádiens NMR

ppm = pars per million

ROESY = rotating-frame Overhauser Spectroscopy/ forgó koordinátarendszerű mag
Overhauser-hatás spektroszkópia

s = szingulett

t = triplett

TEM = transzmissziós elektron mikroszkópia

TOCSY = total correlation spectroscopy/teljes korrelációs spektroszkópia

UV = ultraibolya

WET = water suppression enhanced through T1 effects/felerősített vízelnyomás T1
hatás által

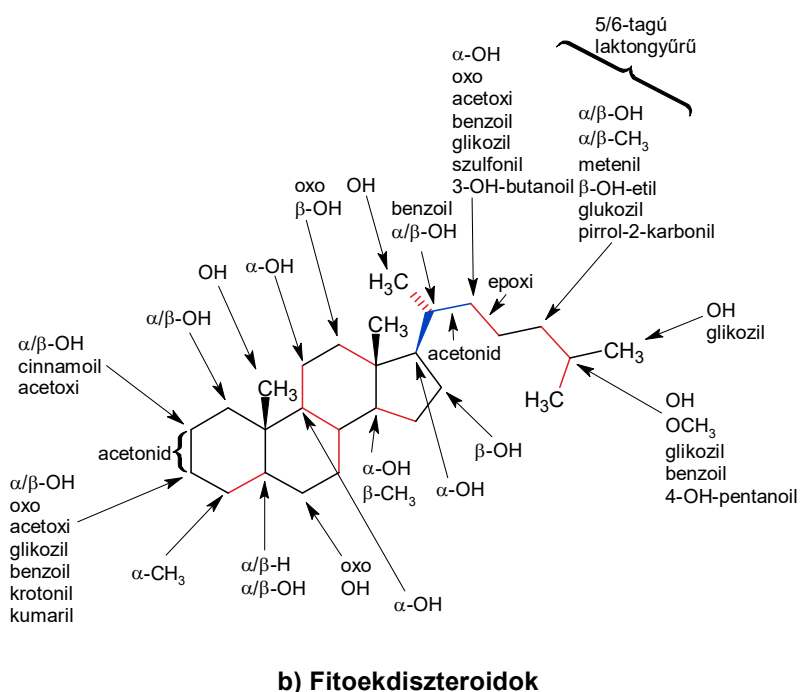
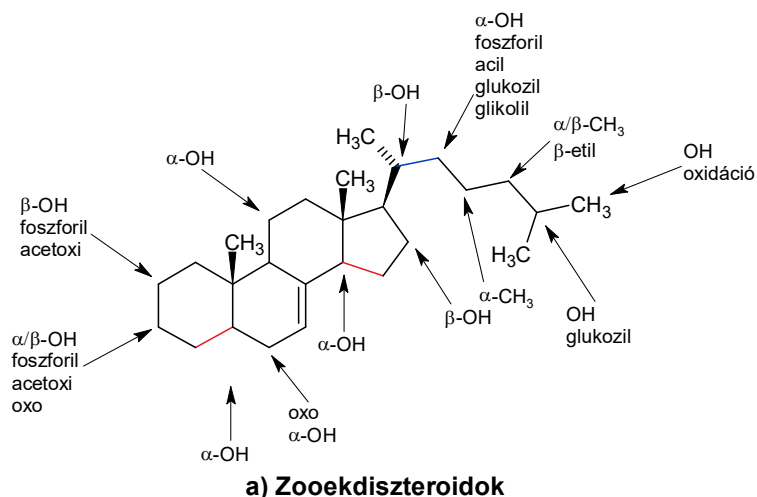
1. Bevezetés

1.1. A vizsgált vegyületek szerkezeti sajátosságai

1.1.1. Ekdiszteroid vegyületek

Korábbi definíció szerint ekdiszteroidoknak az ekdizonhoz szerkezetileg hasonló vegyületeket nevezzük. [1] Később bevezettek egy megkülönböztetést a valódi ekdisztroid és az ekdiszteroid-hasonló vegyületek között. [2] A valódi ekdiszteroidok csoportjába azokat a vegyületeket sorolhatjuk, amelyek esetén a szteránváz (ciklopentano-perhidrofenantrén váz) szerkezeti elem A és B gyűrűjének kapcsolódása *cisz*, és 14 α -hidroxi-7-én-6-on kromofórt tartalmaznak; a besorolás nem veszi figyelembe a hatástani jellemzőket. Az ekdiszteroid-hasonló vegyületek nem teljesítik az összes előbb megnevezett feltételt, de a korábbi, ekdizonhoz való szerkezeti rokonság miatt ide soroljuk ezeket. Az első ekdiszteroidok izolálása ízeltlábúakból történt meg (zooekdiszteroidok), később nagy mennyiségben való előfordulásukat fedezték fel növényekben is (fitoekdiszteroidok). Az Ecdybase adatbázisban jelenleg 510 ekdiszteroid szerkezetet gyűjtöttek össze. [3]

Nem csak forrásukban, hanem szerkezetükben is különbségeket találunk a két csoport között. [4] (1. ábra) A zooekdiszteroidok leggyakrabban C27-29 vegyületek, a szerkezeti diverzitást a különbözőképpen hidroxilált metabolitok, a dehidroxiprekurzorok és a foszforilált embrionális vegyületek adják. A fitoekdiszteroidok körében sokkal változatosabb szerkezeti variációkat találhatunk. Ezek C18-29 vegyületek, az oldallánc különböző pontokon történő lehasadásával C19, C21, C24 vegyületek keletkezhetnek. Jellemző az oldalláncban laktongyűrű képződése a C-24/26/29 karboxilcsoport és a C-20/22/25/28/29 hidroxilcsoport közötti észterképzéssel. Számos ponton történhet hidroxiláció, majd ezen csoportok részvétele konjugációban, glikozidok, éterek, észterek képződésében. Ritkán az A/B gyűrű anellációja *transz*.



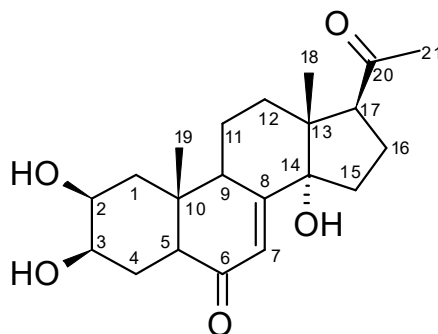
1. Ábra: Zoekdiszteroidok és fitoekdiszteroidok szerkezeti változatai. [4]
 Pirossal jelölt kötések a lehetséges telítetlen kötések, a kékkel jelölt kötések a lehetséges oldallánc hasadást jelölik. A valódi ekdiszteroidok 14 α -hidroxi-7-én-6-on kromofórt tartalmaznak.

Minden szteránvázis vegyület minimum 6 aszimmetria centrumot tartalmaz, ebből következően minimum 2⁶ konfigurációs izomer létezhet. [5] A természetes vegyületekben és az ezekből kiinduló szerkezetileg módosított vegyületekben a 8S, 9S, 10R, 13S konfiguráció állandó. Enantiomer párok csak a szteroid totálszintézisek során

képződnek. A C14 királisan szubsztituált szénatom esetén a természetes vegyületek körében csak a kardiális glikozidokban *R* a konfiguráció, minden más esetben *S*. Ha az A gyűrű telített, C-5 esetén is királis szénatomról van szó, itt mindkét konfiguráció előfordulása közel azonos.

A szteránváz síkja felett álló hidrogénatomokat/szubsztituenseket β -val és vastag vonallal, a sík alatt elhelyezkedő hidrogénatomokat/szubsztituenseket α -val és szaggatott vonallal jelöljük. E szerint a természetes vegyületeken alapuló szerkezetek aszimmetria centrumait 8β , 9α , 10β , 13β , $14\alpha/\beta$ hidrogénekkkel jelölhetjük.

Dolgozatomban tárgyalt ekdiszteroid vegyületek a posztsteron alapvegyület szintetikusan módosított származékai. (2. ábra) A posztsteron egy C21 ekdiszteroid, a C17 szénatomhoz β -helyzetű acetilcsoport kapcsolódik, β -androsztán vázhoz hasonló alapvázal rendelkező vegyület. [6, 5]

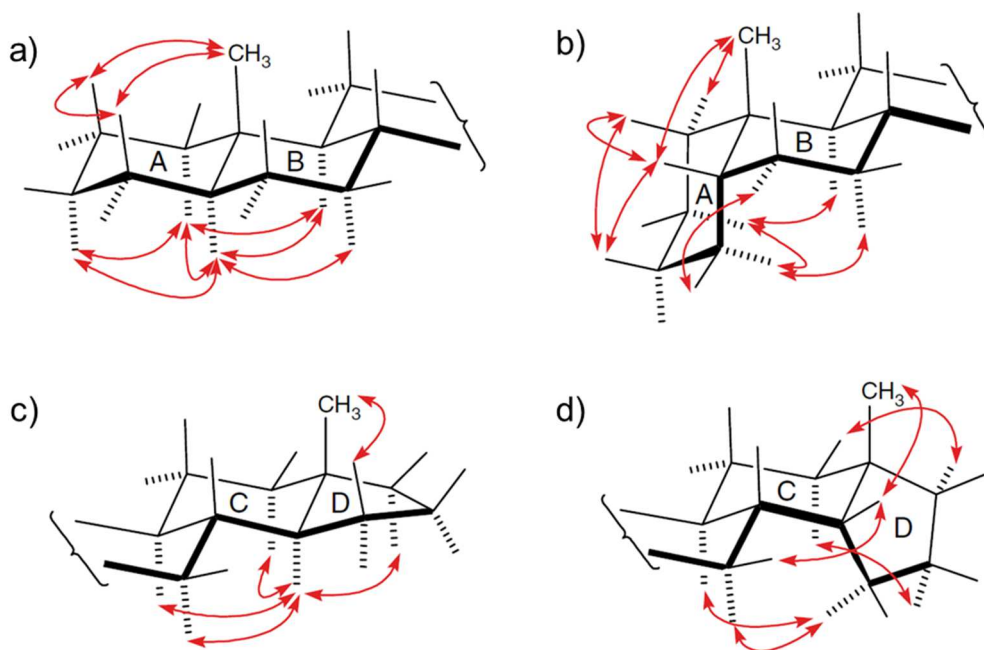


2. Ábra: A posztsteron szerkezete és számozása

A szteránváz háromdimenziós szerkezetét tekintve, minden hattagú gyűrű a ciklohexánhoz hasonlóan a legstabilabb szék konformációt veszi fel, a kapcsolódó hidrogének/csoportok axiális vagy ekvatoriális állásban helyezkednek el. Az öttagú D gyűrű félszék/boríték konformációban található, itt kváziaxiális és kváziekvatoriális állásuként írhatók le az egyes hidrogének/csoportok. [7, 5] Az egyes CH₂ hidrogének diasztereotópok, helyettesítésükkel egy-egy új aszimmetria centrum képződik.

A szteránvázas vegyületek NMR spektroszkópai szerkezetvizsgálata számos jellegzetességgel rendelkezik. [8] A 0,5 és 2,0 ppm közötti régióban vizsgálhatók a nem heteroatomhoz kapcsolódó és sp³ hibridizációjú CH és CH₂ protonok jelei, itt a jelentős átfedések miatt, csak nagy térerejű mérésekkel (>400 MHz) és a kétdimenziós technikák kombinált felhasználásával lehetséges a teljes jelhozzárendelés elkészítése. [9]

A NOE-kölcsönhatáson alapuló módszerek nagy jelentőségűek a diasztereotóp hidrogének, a gyűrűkapcsolódás és az egész háromdimenziós szerkezet meghatározásában. Az anguláris metilcsoportoktól kiindulva meghatározhatók a szteránváz síkjától felfelé álló hidrogének/szubsztituensek. A jellemző NOE-térközelségeket a 3. ábra foglalja össze az A/B és C/D gyűrűk *cisz* és *transz* anellációja esetén.

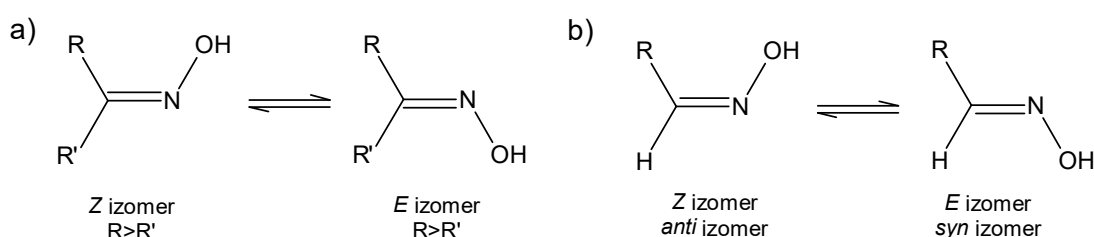


3. Ábra: Karakterisztikus NOE-térközelségek az 5 α H (a), 5 β H (b), 14 α H (c) és 14 β H (d) konfigurációk esetén [8]

A szteroidok esetén a csatolási állandók is nagy jelentőséggel bírnak az axiális és ekvatoriális hidrogének megkülönböztetésében. Axiális-axiális kapcsolat esetén 10,5 – 13,5 Hz; axiális-ekvatoriális kapcsolat esetén 3,5 – 5,0 Hz; ekvatoriális-ekvatoriális kapcsolat esetén 2,5 – 4,0 Hz; geminális hidrogének között 12 – 14 Hz (telítetlen kötés és oxocsoport mellett 15 – 20 Hz) értéket mérhetünk a kérdéses jeleknél.

1.1.2. Oxim típusú vegyületek szerkezeti problémái

Az oximok és oximéterek $R_2C=NOH$ / $R_2C=OR$ szerkezetű vegyületek, melyek aldehidek vagy ketonok hidroxilaminnal vagy származékaival való kondenzációjából származtathatók. [10] Az aldehidekből képződő oximokat aldoximoknak, a ketonokból előállítottakat ketoximoknak nevezzük. A $C=N$ kettős kötés körül két lehetséges izomer különböztethető meg: az *E* és *Z* izomer, amelyeket aldoximok esetében *syn* és *anti* izomerekként is megadhatunk. (4. ábra)



4. Ábra: Ketoximok (a) és aldoximok (b) lehetséges izomerjei a $C=N$ kettős kötés mentén
 $R, R' \neq H$

A két izomer egymásba alakulásának egyensúlyi állandóját (K_{eq}) a következő egyenlettel írhatjuk le:

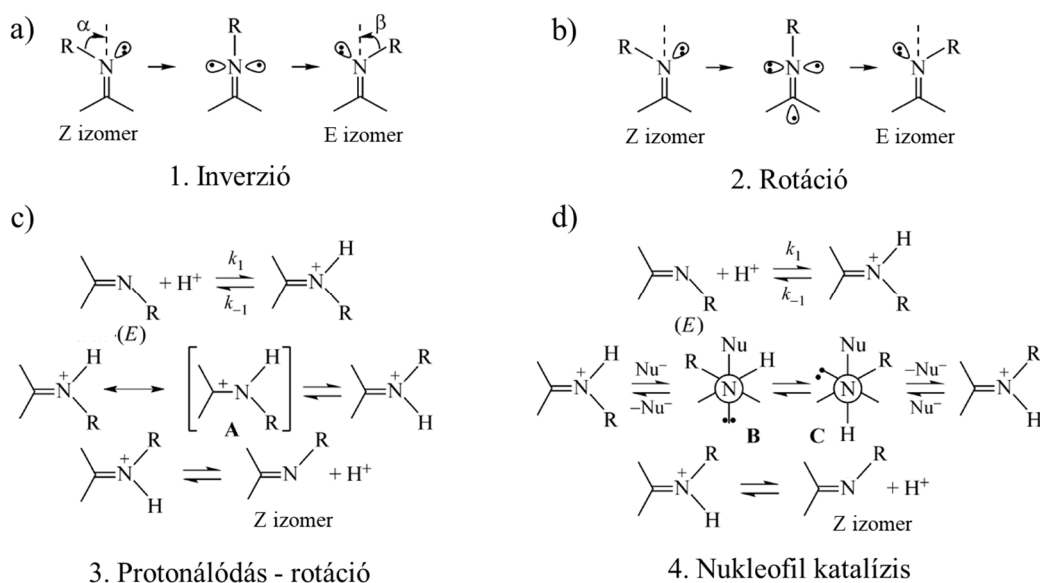
$$K_{eq} = e^{-\frac{\Delta G^0}{RT}} \quad (1)$$

amely egyenletben ΔG^0 a standard szabadentalpia-változás (J/mol), R az egyetemes gázállandó ($8,314 \text{ J} \times \text{mol}^{-1} \times \text{K}^{-1}$) és T az abszolút hőmérséklet (K). (1. egyenlet) [11]

Az oxim típusú $C=NOH$ csoport centrális szénatomja planáris és az alábbi átlagértékekkel jellemezhető a funkciós csoport geometriája: $C=N$ kötéstávolság 1.28 \AA , $C-N-O$ kötésszög $110 - 114^\circ$, a $C-H$ kötéstávolság az aldoxim molekulákban 1.09 \AA . [12] A $C=N$ kötéstávolság szignifikánsan hosszabb, mint az egyéb vegyületek $C=N$ kötésére jellemző érték. Az *E/Z* izoméria markáns hatást gyakorol az $R-C-N$ kötésszögekre. [13] Aldoximok esetén *syn* konfiguráció esetén körülbelül azonos a $H-C-N$ és $R-C-N$ kötésszög a funkciós csoportban, $120 - 123^\circ$; azonban ha *anti* konfigurációval jellemezhető a molekula, az $R-C-N$ kötésszög megnövekszik, a $H-C-N$ kötésszög pedig lecsökken. Ketoximok esetén hasonló hatás észlelhető, itt is a nagyobb kötésszög-érték

található az OH-val azonos oldalon ($124 - 129^\circ$) és a kisebb érték ($113 - 116^\circ$) a hidroxilcsoporttal ellentétes oldalon. [14]

Az izomerek egymásba alakulására vonatkozóan a legismertebb mechanizmusok az oximcsoport síkjában történő inverzió egy lineáris átmeneti állapottal; a síkból kilépő rotáció egy dipoláris átmeneti állapottal; és a katalitikus folyamatok. [15, 16] (5. ábra) Az inverziós és a rotációs mechanizmus együtt, egy folyamatban megy végbe, melynek eredője egy kis energiájú átalakulás, elősegítve az izomerizációt.



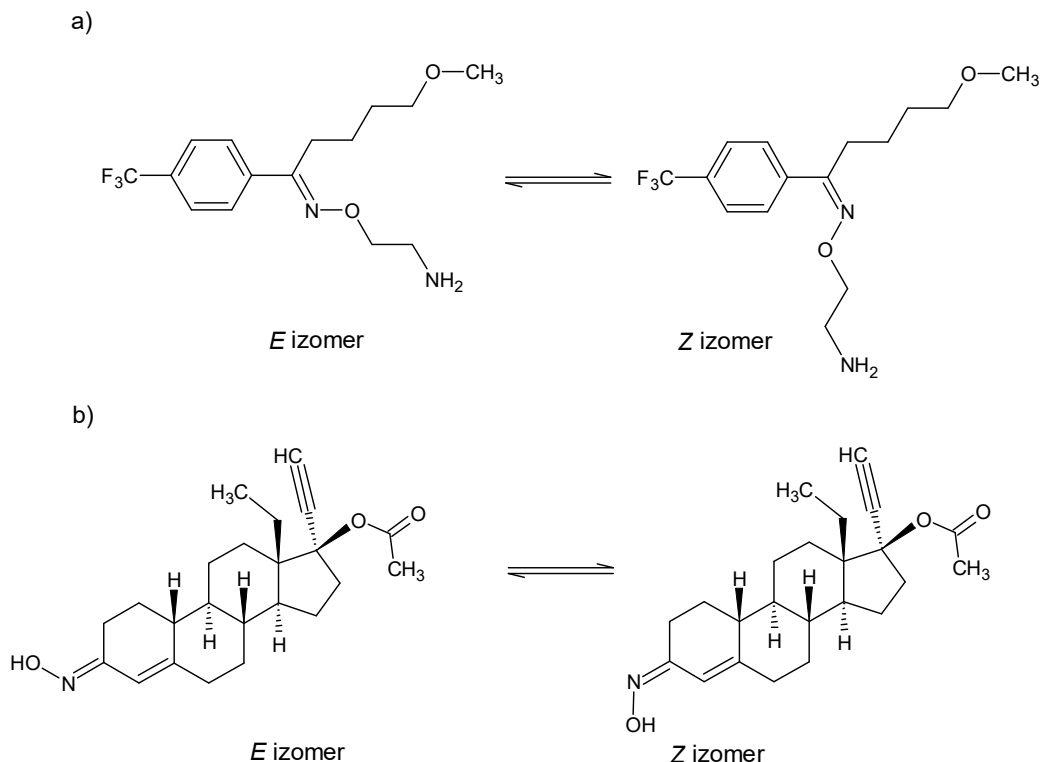
5. Ábra: Az oximok E/Z izomerizációjának lehetséges mechanizmusai [15, 16]

a) inverzió; b) rotáció; c)-d) katalitikus folyamatok

Az oximok E/Z izomerizációját mindhárom halmazállapotban vizsgálták elméleti és kísérletes módszerekkel. Az acetaldoxim és a fenilacetaldoxim Z izomerként kristályosodik [17], majd oldódás után mint az E és Z izomerek keveréke található. Acetaldoxim esetén 40°C -on arányuk 40 : 60, a számított energiagát az izomerek között 0,27 kcal/mol; a fenilacetaldoxim 54 : 46 arányú izomerelegyként található oldatban, köztük 0,1 kcal/mol nagyságú számított energiagáttal. [18] A nagyon kis energiagáttal jellemezhető izomerizációs átmenetek spontán bekövetkeznek. A jelentősen csökkent energiakülönbséget oldatban/folyadékfázisban az oldószerpolaritásnak, savak és bázisok hatásának, illetve asszociációs jelenségeknek tulajdonítják. [19-22] Az oldószerrel való

H-hidak kialakulásának lehetősége nagyban befolyásolja az izomerek arányát az adott oldatban. [20] NMR vizsgálat alapján heptánban 33 : 67 volt az acetaldoxim *E* és *Z* izomerek aránya, míg deutérium-oxidban ugyanez az arány 56 : 44; ennek oka a heptánban való intramolekuláris H-hidak általi önasszociáció lehetősége és a deutérium-oxid oldószerrel való H-hidak kialakulása. Az *E/Z* egymásbaalakuláshoz vízben 13 kcal/mol, széntetrakloridban 16 kcal/mol szükséges. [22] A para-metoxi-benzaldehidoxim esetén a savkoncentráció szerepe döntő az átalakulásban: magas savkoncentrációnál hidrolízis és izomerizáció párhuzamosan végbemegy, ha alacsony a protonkoncentráció csak a hidrolízis következik be. [23] Az *E/Z* izomerizáció mellett az oximvegyületeknél tautóméria is lehetséges nitron vagy nitrozo vegyületekké. [24, 25]

Számos biológiailag aktív vegyület esetében előfordul az oximcsoport *E/Z* izomériája, a két izomer között különbség található a hatás tekintetében. [26-28] A Magyar és Európai Gyógyszerkönyv is több, oxim-típusú vegyületet ír le. A cefepim dihiroklorid monohidrát [29], a cefixim [30], a cefpodoxim proxetil [31], a ceftazidim pentahidrát [32], a ceftriaxon nátrium [33], a cefuroxim axetil [34], a cefuroxim nátrium [35] és a fluvoxamin maleát [36] esetén a *Z* izomert tartják nyilván a hatóanyagként, az *E* izomer szennyezőként szerepel, határértéke 0,2 – 1,0 % között megengedett. A roxitromicin [37] esetén az *E* izomer az engedélyezett forma, a *Z* izomert szennyezőként 0,5%-ban tartalmazhatja. A Gyógyszerkönyvben a szennyező izomer kimutatására és mennyiségi meghatározására HPLC módszert adnak meg. Kizárólag a norgesztimát esetén törzskönyvezett az *E* és *Z* izomerek keveréke, 1,27 – 1,78 arányban, szintén HPLC módszerrel állapítható meg a két izomer aránya. [38] (6. ábra)

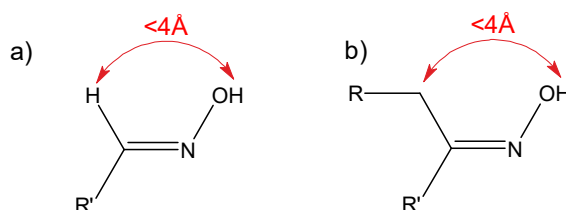


6. Ábra: *A fluvoxamin (a) és a norgesztimát (b) E és Z izomerei*

Az irodalomban elérhető néhány ekdiszteroid oxim NMR adatainak leírása, az ^{13}C atom kémiai eltolódás különbségét felhasználva az egyes izomerekben az *E/Z* konfiguráció megállapítható. [39] 20-hidroxiiekdizon-oxim, ennek diacetonid és 14,15-anhidro származékai esetén az oxim OH csoportjához α pozícióban található metilén ^{13}C atom kémiai eltolódása alapján állapították meg a konfigurációt. [40] *Anti* állásban ez a kémiai eltolódás 42,6 – 49,5 ppm között, míg *syn* állásban 37,9 – 38,2 ppm között adódott. A 20-hidroxiiekdizon-*O*-(2-klórpipridin-5-ilmetil)oxim esetén az *E* izomerre deuteropiridinben 42,2 ppm-et, deuterometanolban 42,6 ppm-et mértek a C_αH kémiai eltolódására. [41] A 20-hidroxiiekdizon C-20 oxo származékából képzett oxim esetén röntgendiffrakcióval állapították meg a C-20 oxim vegyület oximcsoportjának konfigurációját. [42] A 20-hidroxiiekdizon 2,3;20,22-diacetonid 6-oxim és oximéter származékainak vizsgálata során a C_α $\Delta\delta_{\text{syn-anti}}$ paraméterekre C-5 ^{13}C atom esetén 5,2 ppm különbséget, a C-7 ^{13}C atom esetén 7,5 ppm különbséget mértek. [43]

A kémiai eltolódás összehasonlításán felül a NOE-térközelségek is nagy jelentőséggel bírnak a konfiguráció eldöntésében. Oximok esetén az OH csoport

hidrogénje és a $C_\alpha H_n$ közötti korreláció eldöntheti az oximcsoport konfigurációját. A $C=N$ kötés azonos oldalán elhelyezkedő hidrogének NOESY vagy ROESY keresztcsúcsot adnak. [44] (7. ábra) Mind oximok, mind oxim-éterek esetén széleskörűen alkalmazták a NOESY és ROESY NMR kísérleteket. [45-48] Módszer használhatóságát oximok esetén limitálja az OH cseréje az oldószer OD vagy ND atomjaival.



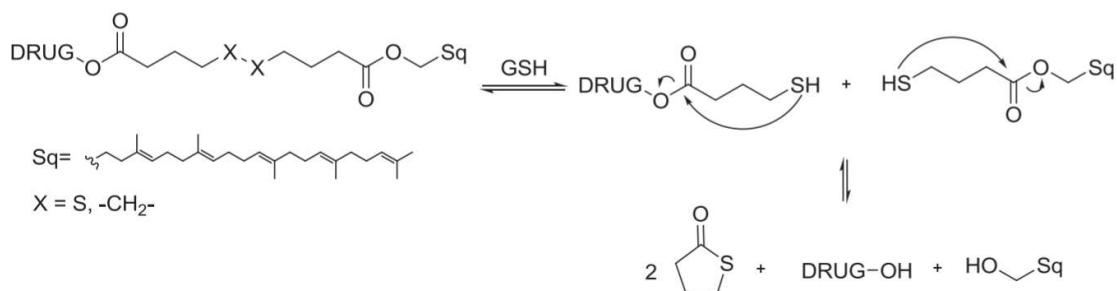
7. Ábra: A konfiguráció meghatározásának szempontjából fontos NOE-térközelségek

a) aldoximok és b) ketoximok esetén

1.1.3. Szkvalén-konjugátumok

Nanométerű asszociátumok előállításával az adott gyógyszervegyületek több tulajdonsága javítható: kontrollált felszabadulás és eloszlás, abszorpciónövelés vagy védelem a vegyület degradációjával szemben. [49]

A szkvalén-linker oldallánc jelenlétével az adott gyógyszermolekula prodrugként viselkedik. [50] Az általunk vizsgált vegyületekben az aktív vegyület és a szkvalén lánc között szecbacinsav (8. ábra: $X=CH_2$) vagy diszulfidhidat (8. ábra: $X=S$) tartalmazó analógja található. A szkvalén molekularész az önrendeződésért és a biológiailag aktív vegyület védelméért felelős a szervezet káros hatásaival szemben, míg a linker egység (= összekötő molekularész) az intracelluláris felszabadulásban játszik szerepet. [51, 52] Amennyiben a kapcsolat a linker és a gyógyszermolekula között pH érzékeny, ez a tulajdonság felhasználható az aktív vegyület célzott felszabadulásához a tumorsejtek savas belső környezetében. [53] A diszulfidhidat tartalmazó vegyületek különösen előnyösek a szabad gyógyszermolekula célzott hatóanyagfelszabadulása szempontjából. A rákos sejtekben jelenlevő megnövekedett glutationkoncentráció hatására hasad a linker régió, majd tiolakton kilépése közben szabaddá válik a gyógyszermolekula. [54] (8. ábra)

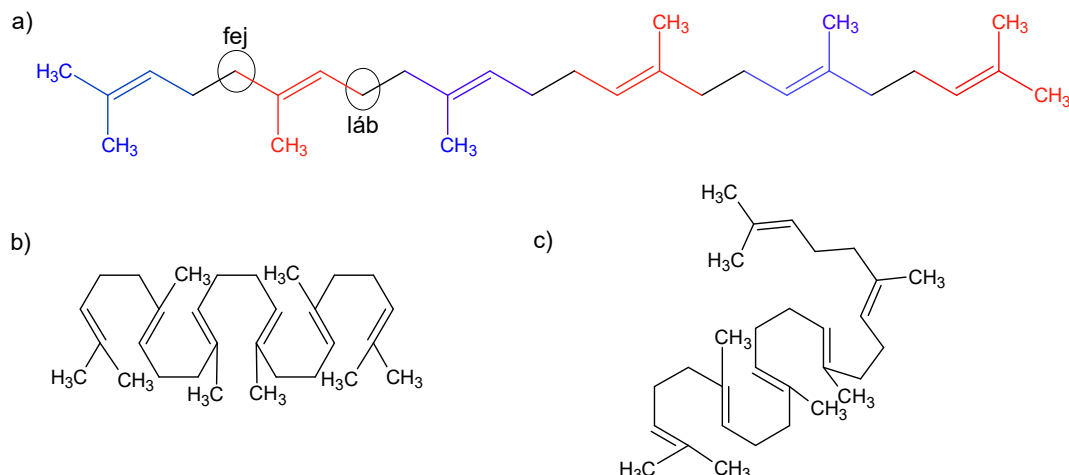


8. Ábra: A szkvalén-linker oldallánc lehasadásának feltételezett mechanizmusa [54];

GSH=glutathion

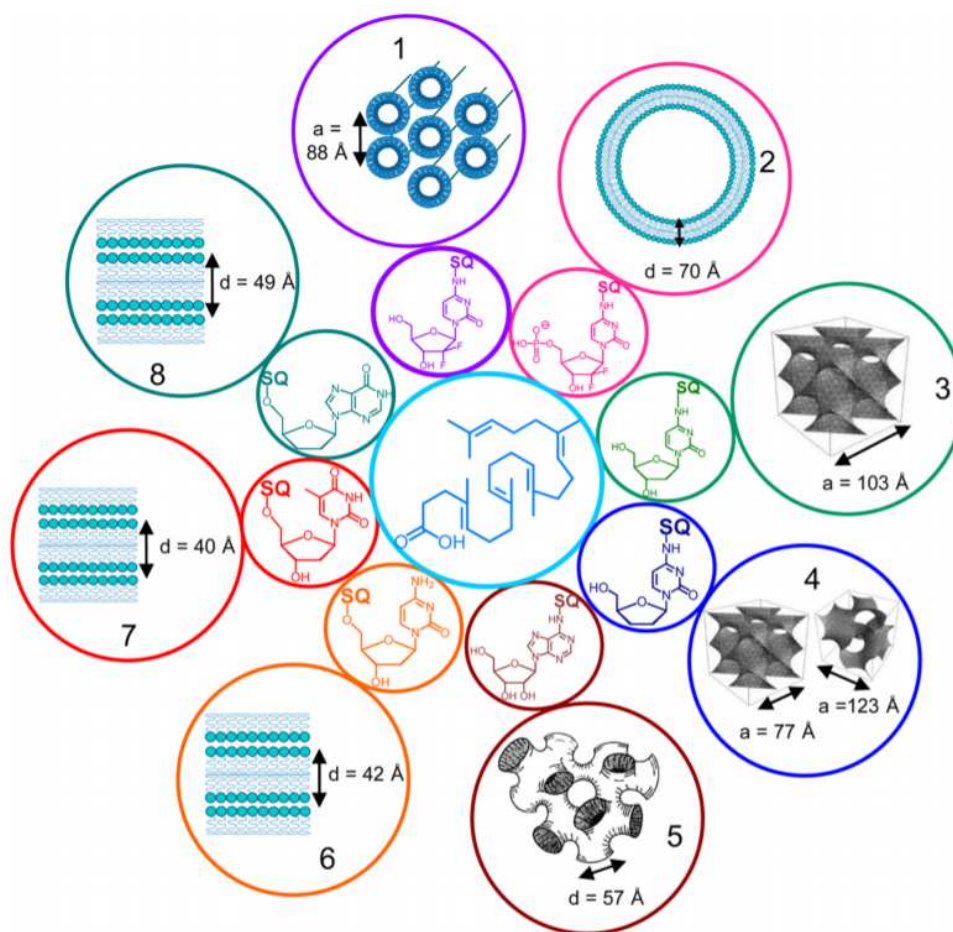
Számos esetben előállították a szkvalenolált származékait rákellenes [52, 55, 56], antibiotikus [57] és antivirális [58] vegyületeknek és igazolták ezek előnyös tulajdonságait.

A szkvalén egy aciklusos triterpén (C₃₀), hat izoprénrészből épül fel, a harmadik és negyedik izoprénegység között láb-láb, a többi egység között fej-láb illeszkedéssel. [59, 60] Bioszintézise két farnezilegységből valósul meg, ezek láb-láb összekapcsolódásával. Minden terpenoid esetén a kettőskötések mentén az *E* konfiguráció van jelen. A környezettől függően többféle konformáció létezik. Apoláros oldószerekben a kitekeredett, szimmetrikus formája található, míg poláros oldószerekben, víztartalmú közegekben feltekeredett vagy szteroidszerű konformációban. [61, 62] (9. ábra) Ezt a tömörebb szerkezetet hidrofób kölcsönhatások stabilizálják, a kettős kötések védve helyezkednek el az oldószerrel szemben. [63] Szteroidszerű konformációban képes a membránba diffundálni [64] és ugyancsak ez a konformáció a fontos amikor a szkvalénból történik a koleszterin és egyéb szteránvázas vegyületek bioszintézise [65]. Emellett magának a szkvalénnek is rákmegelőző és kemoprotektív hatást tulajdonítanak. [66]



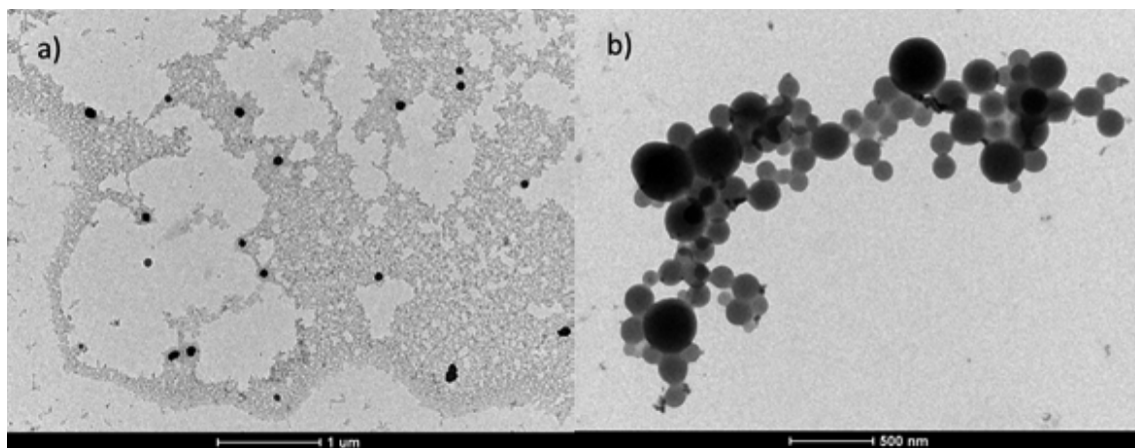
9. Ábra: A szkvalén szerkezete a) kitekeredett konformáció; b) feltekert konformáció; c) szteroid-szerű konformáció; a páros és páratlan izoprén egységek különböző színnel jelölve

A szkvalén-konjugátumok vizes közegben változatos szupramolekuláris rendszereket alkothatnak. [67] (10. ábra) Micellás/liposzómás asszociátumra példa a gemcitabin-monofoszfáttal képzett konjugátum [68], kettősrétegű lamellás nanorészecskére a timidin-konjugátum [67]. A doxorubicin esetén többféle szupramolekuláris rendezettség létezik, egyik a megnyúlt „nanospagettinek” nevezett rendszer. [69] Az inverz köbös (2',3'-dideoxycitidin-szkvalén konjugátum) [70] és hexagonális rendezettségű részecskék (gemcitabin-szkvalén-konjugátum) [71] képesek a membránba épülni. Rövidtávú rendezettséget, amorf struktúrát mutat a penicillin [57] szkvalénnal képzett származéka.



10. Ábra: Szkvalén-nukleozid konjugátumok szupramolekuláris szerkezete [67]
Az egyes konjugált vegyületek és ezek szupramolekuláris szerkezete azonos színnel
jelölve

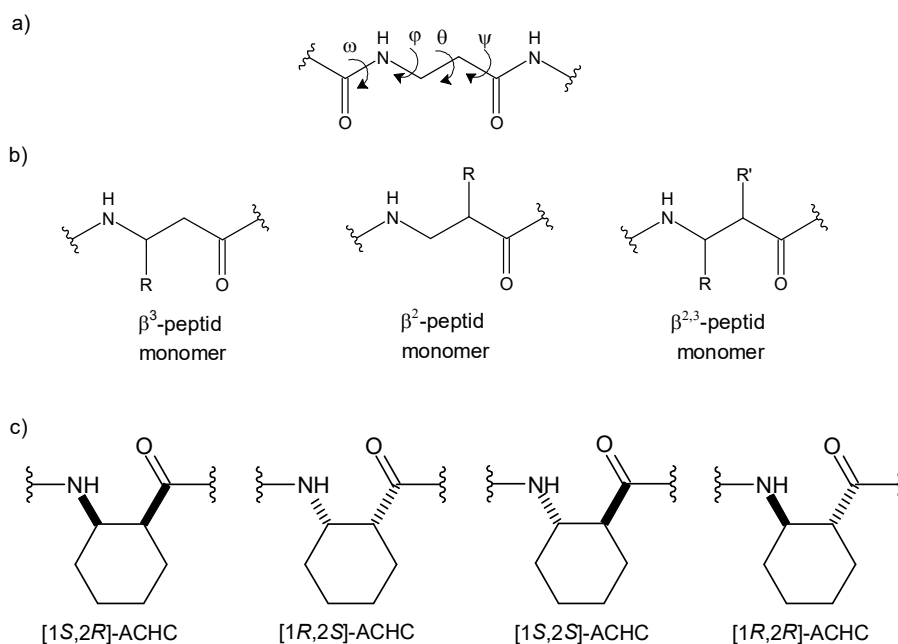
A dolgozatomban tárgyalt szkvalén konjugátumok közül az **1b** és **1c** vegyületek nanorészecske képzését vizsgálták DLS és TEM módszerrel. (szerkezetük a 35. oldal 18. ábráján látható) [72] (11. ábra) A DLS vizsgálatok során monodiszperz képződményekként azonosították ezeket, **1b** vegyületre kb. 200 nm hidrodinamikai átmérőt állapítottak meg, **1c** vegyületre kb. 370 nm-t. Hetero-nanorészecskékben is vizsgálták a származékokat, doxorubicin-szkvalén konjugátummal közösen képzett rendszerek hidrodinamikai átmérője kis eltérést mutatott a homo-nanoasszociátumokhoz képest, kb. 190 nm és 300 nm átmérőjű részecskék keletkeztek. A TEM vizsgálatok során szintén tömör részecskéként jelentek meg, kissé csökkent átmérővel a homo-nanoasszociátumok és közel hasonló átmérővel a hetero-nanopartikulák.



11. Ábra: **1c** TEM képe; a) homo-nanorészecske-képzés; b) hetero-nanorészecske-képzés doxorubicin-szkvalén konjugátummal [72]

1.1.4. β -Peptidek

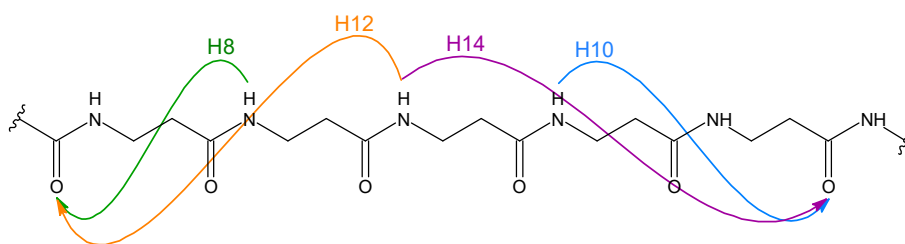
A foldamerek olyan biomimetikus polimerek, amelyek képesek önrendeződéssel szabályos másodlagos szerkezetet kialakítani másodlagos kötőerők segítségével. [73, 74] A hagyományos α -peptidekkel szemben a peptidomimetikus foldamerek előnye a nagyobb stabilitás proteolízissel/metabolizmussal szemben és a jobb membránpermeabilitás. [75, 76] A peptidomimetikus foldamerek egyik legfontosabb képviselői a β -peptidek. A β -peptidek β -aminosavakból épülnek fel, amelyekben az aminoscsoport a β -szénatomhoz kapcsolódik. Az α - és β -szénatom változatosan szubsztituálható, amellyel nagyfokú szerkezeti diverzitás érhető el, és ez a konformációs viselkedést is döntően befolyásolja. [77, 78] Megkülönböztethetünk β^2 -, β^3 -monoszubsztituált, $\beta^{2,3}$ -diszubsztituált aminosavakat, ez utóbbin belül léteznek a ciklusos β -aminosavak, amelyek igencsak jelentősek az önrendeződő β -peptidek körében. [79] (12. ábra)



12. Ábra: a) A β -peptidek gerincét leíró torziós szögek Balaram konvenció szerint [80]; b) a β -peptidek szubsztitúciós mintázatai; c) ciklusos aminosavak lehetséges konfigurációs izomerjei az ACHC példáján

1.1.4.1. A β -peptidek másodlagos szerkezete

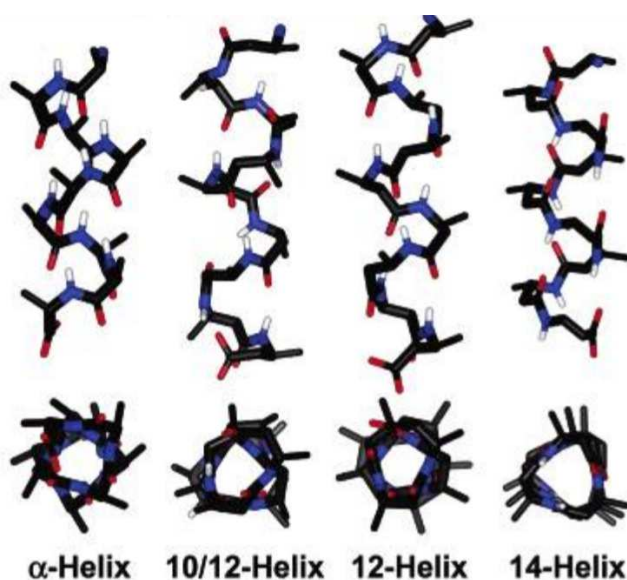
A β -peptidek nagyfokú konformációs stabilitással rendelkeznek, így rövidebb szekvenciák képesek az α -peptidekkel azonos rendezettségi fokot felvenni. Figyelembe véve az újonnan megjelenő θ szöget, ennek ellenkezője lenne várható. A három torziós szög jelenlétével megnő a konformációs tér, a csökkent önrendeződés a kedvező az entrópiánövekedéshez. Azonban a monomerszintű lokális konformációs preferenciák ellensúlyozzák az entrópiavesztést, így mégis a rendezett szerkezetek a kedvezőbbek, főként a ciklusos β -aminosavakból felépülő peptidláncok esetén. [81-84] Másodlagos szerkezetként hélixek, redőket létrehozó szálak és kanyarszerkezetek jöhetnek létre. [85] Különböző helikális rendszerek képződhetnek: H14 [86, 84], H12 [81, 77], H10/12 [87, 88, 77] és H14/16 [89] hélixek, a H-hidas kölcsönhatások által képződött pszeudogyűrűk tagszáma szerint. [90] (13. ábra)



13. Ábra: A β -peptid hélixek nomenklatúrája a H-hidak által kialakított pszeudogyűrűk szerint [90]

A rendezett hélix vagy kanyar szerkezethez gauche konformáció szükséges a C_α - C_β kötés mentén (θ szög). A szubsztituált aminosavakban korlátozott a konformációs szabadság, az alkilszubsztitúció esetén az *anti* konformációban és a ciklusos $\beta^{2,3}$ -diszubsztituált aminosavak esetén a legkifejezettebb a gauche állású konformer. [81, 91] Gyűrűs β -aminosavak esetén a *transz* konfiguráció a helikális másodlagos szerkezetnek kedvez, a *cisz* konfiguráció homokirális rendszerekben a kitekeredett konformációt segíti elő. [90] A gyűrűméret meghatározza a pontos θ torziós szöget, amely adat befolyásolja a képződő hélix típusát. [81] A gauche konformációt továbbá a karbonil szénatom és az amid nitrogén parciális töltései között kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatás is stabilizálja az adott β -aminosav egységen belül. [92]

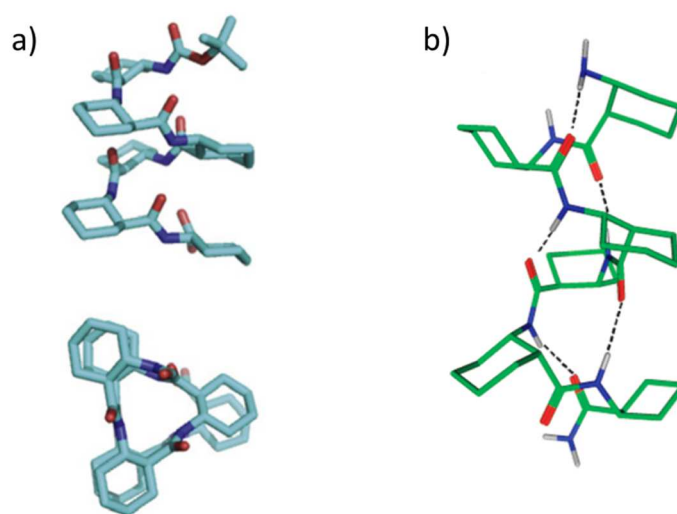
A H14 hélixet az $\text{NH}^i - \text{C}=\text{O}^{i+2}$ H-híd stabilizálja, az α -hélixekhez képest szélesebb átmérővel és monomerenként kisebb menetemelkedéssel rendelkeznek, egy fordulatban három aminosav szerepel. A C=O és NH csoportok az N és C-terminálisok felé mutatnak, nettó dipólust okozva. [93] A H12 hélixek az $\text{NH}^i - \text{C}=\text{O}^{i-2}$ H-hidas kölcsönhatás által jönnek létre, átmérőjük nagyobb az α -hélixeknél, nyújtottabb konformációt alkotnak, egy fordulatban 2 és fél aminosav található. A C=O és NH csoportok orientációja a természetes α -hélixekkel azonos. [81] A H-10 hélixek esetén a H-hidak ($\text{NH}^i - \text{C}=\text{O}^{i+1}$) orientációja megegyezik a H14 hélixekkel. [94] A H8 hélix H-hidai a $\text{NH}^i - \text{C}=\text{O}^{i-1}$ csoportok között létesülnek. [90] A H10/12 hélix egy alternáló rendszer, a H-hidak orientációi is váltakozva jelentkeznek. [87, 88] Utóbbi három hélix típus is nyújtottabb, kisebb átmérőjű másodlagos szerkezet az α -hélixsel összehasonlításban. (14. ábra)



14. Ábra: A természetes aminosavakból felépülő α -hélix és a β -peptidek gyakoribb helikális szerkezetei [95]

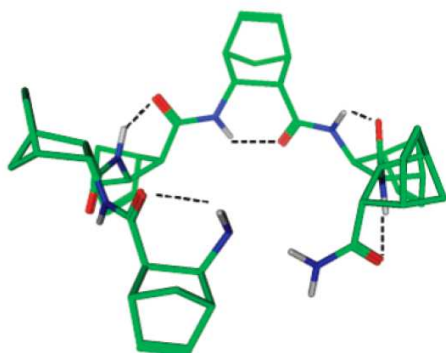
1.1.4.2. A vizsgált vegyületeket felépítő β -aminosavak

A *transz*-ACHC (*transz*-2-aminociklohexánkarbonsav) az egyik leggyakrabban használt építőegység H14 hélixek előállításához. Már 4 aminosavat tartalmazó szekvencia esetén létrejön a rendezett hélikális szerkezet. [86] Ebben az egységben a θ szög 55° , amely elősegíti a *gauche* konformáció kialakulását. Kis hányadú ACHC-t α -peptid szekvenciába építve máris H14 hélix figyelhető meg. [96] A *cisz*-ACHC alternáló heterokirális sztereokémiai mintázat esetén H10/12 hélix típust azonosítottak, amely poláros oldószerekben önasszociációt mutat. [87] (15. ábra)



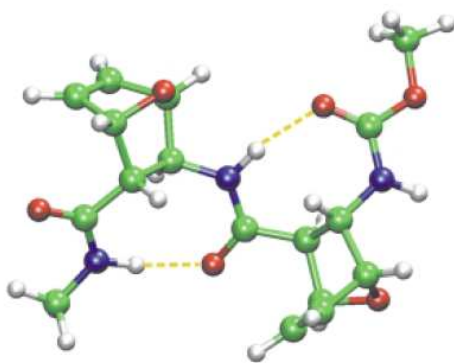
15. Ábra: a) *Transz*-ACHC egységekből felépülő hexamer háromdimenziós szerkezete [97]
 b) *Cisz*-ACHC egységekből alternáló heterokirális sztereokémiai mintázat esetén felépülő H10/12 háromdimenziós szerkezete [87]

A *diexo*-ABHEC (*diexo*-3-aminobicyclo[2.2.1]hept-5-én-2-karbonsav) egység esetén a 2*S*,3*R* vagy 2*R*,3*S* izomerekből felépülő szekvenciákban szálszerű másodlagos szerkezetet azonosítottak az $\text{NH}^i - \text{C}_\beta\text{H}^{i+1}$ és az $\text{NH}^i - \text{C}_\beta\text{H}^{i-1}$ NOE térközelségek alapján. [98] Abban az esetben, ha felváltva szerepeltek a fenti aminosavegységek a peptidláncban, az $\text{NH}^i - \text{C}=\text{O}^i$ H-hidak kialakulásával egy kanyarulatosszálszerű szerkezet alakult ki. [99] Szintén alternáló tetramerek és hexamerek esetén körszerű hajlat alakult ki konformációként, kizárva a kis átmérőjű hélixek képződését. [87] (16. ábra)



16. Ábra: A diexo-ABHEC hexamer háromdimenziós szerkezete alternáló heterokirális sztereokémiai mintázat esetén [87]

Az oxanorbornén származékok - diexo-3-amino-7-oxabicyclo[2.2.1]hept-5-én-2-karbonsav (diexo-AOBHEC) – már dimerként is rendezett struktúrát vesznek fel, 8-tagú H-hidas pszeudogyűrű létrejöttével a H8 hélix azonosítható. [100] (17. ábra)



17. Ábra: A diexo-AOBHEC dimer háromdimenziós szerkezete [100]

1.1.4.3. Módszerek a β -peptidek konformációjának vizsgálatában

Az NMR spektroszkópai módszerek mellett cirkuláris dikroizmus spektroszkópai és röntgenkristallográfiai módszerekkel vizsgálható a β -peptidek másodlagos szerkezete. A dinamikus fényszórásmérés és elektronmikroszkópos technikákat a harmadlagos szerkezet, az önasszociáció felderítésében használjuk.

Az NMR spektroszkópai vizsgálatok esetén oldatban jelen levő konformációról tájékozódhatunk. Néhány mM koncentrációban történik a mérés, a kontrollálatlan aggregáció elkerülésének érdekében. Már a ^1H NMR spektrum jellemző a rendezettség jelenlétére: az amid NH jelek megfelelő eloszlása a spektrumban a szabályos rendezett szerkezetek esetén látható, az átfedő jelek a random szerkezetek esetén fordul elő. Még a homooligomerek esetén is jól megkülönböztethetők az amid NH jelek. Ez a jelenség az α -peptidek esetén is jellemző. A gerincjelek hozzárendelése a hagyományos kismolekulás jelhozzárendelések elkészítéséhez hasonlóan történik, COSY, TOCSY, ROESY módszerek alkalmazásával. Az amid NH hidrogének 8,5 – 7,5 ppm között, a C_βH_n hidrogének 4,2 – 3,5 ppm között, a $\text{C}_\alpha\text{H}_n$ hidrogének 3,5 – 2,5 ppm között jelentkeznek. A NOE-kölcsönhatások nagyon hasznosak a másodlagos szerkezet meghatározásában, a karaktersztikus keresztcsúcsok által definiálhatók a rendezett állapotban közel kerülő molekularészek és a hélix típusa. A következő NOE-térközelségek jellemzők az egyes helixekre: H14: $\text{NH}^i - \text{C}_\beta\text{H}_n^{i+3}$, $\text{NH}^i - \text{C}_\beta\text{H}_n^{i+2}$, $\text{C}_\alpha\text{H}_n^i - \text{C}_\beta\text{H}_n^{i+3}$; H12: $\text{NH}^i - \text{C}_\beta\text{H}_n^{i-3}$, $\text{C}_\alpha\text{H}_n^i - \text{C}_\beta\text{H}_n^{i-3}$; H10: $\text{NH}^i - \text{C}_\beta\text{H}_n^{i+2}$, $\text{NH}^i - \text{C}_\beta\text{H}_n^{i+1}$, $\text{C}_\beta\text{H}_n^i - \text{C}_\alpha\text{H}_n^{i+2}$. Az amid NH csoport hidrogénatomjai könnyen cserélnek az oldószer deutériumatomjaival. Rendezett konformerekben, ha H-hídban található az adott csoport, az oldószerrel szemben nehezen hozzáférhető, így a csere lassúvá válik. Minél stabilabb a kialakult másodlagos szerkezet, annál lassabban megy végbe a csere. Random szerkezetben a szabad amid NH-k könnyen hozzáférhetők az oldószer számára, így cseréjük deutériumatomra gyorsan, akár azonnal megtörténik beoldás után. Ezen vizsgálatokat CD_3OD -ban végezzük.

A cirkuláris dikroizmus technikát a távoli UV tartományban (250 – 178 nm) alkalmazhatjuk β -peptidek vizsgálatához, az optikailag aktív amidcsoport elnyelése ebben a tartományban jelentkezik. A H14 hélixre jellemzőek a kb. 215 és 195 nm-nél fellépő ellentétes előjelű sávok. Balmenetes hélix esetén a maximum található a kisebb, a minimum a nagyobb hullámhosszértéknél.[90] Jobbmenetes hélix esetén ez ellentétesen

látható. A H12 hélixek CD spektrumában szintén megjelenik a 205 nm és 190 nm közeli sáv, de a H14 hélixsel ellentétes előjellel az adott jobb- /balmenetes szerkezetek esetén. Emellett az $n \rightarrow \pi^*$ átmenetre jellemző negatív előjelű sáv 220 nm értéknél karakterisztikus a H12 hélixre. [90] A H10 helikális szerkezetek a H14 hélixekhez hasonló spektrumot szolgáltatnak, de kisebb intenzitású CD sávokkal. [94] A H10/12 helikális rendszerekben az amidkötések kétféle orientációja miatt kisebb helikális dipól keletkezik, így CD sávjaik szintén kisebb intenzitásúak, rendszerint csak a 205 nm közeli sáv detektálható. [90]

A DLS és TEM technikák esetén a nanoméretű asszociátumok vizsgálhatók, így a kialakult szupramolekuláris szerkezetek, mint micellák, nanoszálak. A PFG-NMR módszerekkel (pl. DOSY) az adott részecske diffúziós koefficiense határozható meg, amelyből a hidrodinamikai sugár számítható. Ez összehasonlítva a szabad, nem asszociálódott molekula hidrodinamikai sugarával kiszámítható az asszociátumban résztvevő egységek száma.

Röntgenkristallográfiai vizsgálat során a kristályos mintából kapható információ a másodlagos szerkezetről. [101, 102] Az egykristály előállítása limitáló tényező a módszer használhatóságának szempontjából. Főként nanoméretű asszociátumok esetén válik nehezzé/ lehetetlenné a vizsgálatához szükséges egykristály előállítása.

1.2. Szerkezetfelderítés NMR és ECD spektroszkópiával

1.2.1. A szerkezetmeghatározás stratégiája

Az egydimenziós NMR spektrumokban az egyes jelek kémiai eltolódása alapján tájékozódhatunk az adott csoport hibridizációjáról, a szomszédos atomok/funkciós csoportok hatásáról. A vicinális és geminális csatolások segítségével szintén a környezetről kapunk információt, a konnektivitás mellett a protonok relatív térhelyzetére is következtethetünk. A ^1H NMR spektrumokban a megfelelő felvételi beállításokat alkalmazva az integrált intenzitás értékek kvantitatív adatot szolgáltatnak a jelet adó atommagok relatív számáról. A mindennapi NMR spektroszkópiai szerkezetfelderítésben leggyakrabban használt magok a ^1H , a ^{13}C és a ^{15}N . A két és többdimenziós mérések felhasználásával további tájékoztatást nyerünk az egyes atomcsoportok konnektivitásáról, konfigurációs, konformációs és dinamikus tulajdonságairól. Azonos magfajták közti kölcsönhatás feltérképezésekor homonukleáris, különböző magfajták kölcsönhatásának vizsgálatakor heteronukleáris mérési módszerekről beszélhetünk. A kölcsönhatások kiépülhetnek direkt módon, kötő elektronok által, illetve téren keresztül, dipól-dipól kölcsönhatásokkal.

1.2.2. NMR technikák a szerves szerkezetfelderítésben

Az egy kötésen keresztül kapcsolódó ^1H és X (leggyakrabban ^{13}C , ^{15}N) atomok felderítésére alkalmazzuk a HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), HMQC (Heteronuclear Multi Quantum Coherence) módszereket az egy kötésen keresztüli csatolásra optimalizálva ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ esetén kb. 145 Hz). A HSQC módszer pulzusszekvenciájában INEPT vagy reverz INEPT elemek felelősek a mágnesezettség átviteléért a hidrogénről a másodlagos magtípusra. A t_1 várakozási idő után egy retro-INEPT szekvenciaelemmel történik a mágnesezettség visszatérése az ^1H magokra, majd innen detektáljuk a jelet folyamatos X mag lecsatolás mellett. [103] A gradiens NMR módszer megjelent a HSQC és más NMR technikákban is, ezen elemek pulzusszekvenciába való beépítése számos előnyt szolgáltat: pl. rövidebb mérésidő, artefakt jelek csökkenése, fázis-ciklizáció kihagyható, ^1H - ^{12}C / ^1H - ^{14}N nem kívánt mágnesezettség elnyomása. [104-107] Az editált HSQC mérés során kapott spektrumban

ellentétes fázisban láthatók a CH/CH₃ és a CH₂ jelek, ennek megvalósítása történhet ¹³C z-szűréssel, echo-antiecho módszerrel vagy PEP-módszerrel. [108]

A HMBC módszer esetén a három- és két kötésen keresztüli korrelációkat detektálhatjuk, a kísérlet a multiple-quantum-coherence technikán alapszik. [109] A direkt, egy kötésen keresztüli kölcsönhatások minimalizálásáért egy low-pass *J*-filtert (aluláteresztő szűrő egy kötésen keresztüli csatolási állandókra optimalizálva) alkalmaznak. [110] A három kötésen keresztüli ¹H – ¹³C csatolások 0 – 14 Hz széles tartományban helyezkednek el, ezért általában egy köztes 7 – 8 Hz-es értékre állítva végezzük a kísérleteket.

A homonukleáris COSY módszer esetén a spektrum diagonális csúcsából kiindulva az egyes hidrogének a csatoló partnerekkel korrelációt mutatnak. [111] Újabban a Double-quantum filtered COSY (DQF COSY) használatos, amely kiküszöböli a diagonális diszperzív jeleit, így az átlóhoz közel eső keresztcsúcsok is fejthetővé válnak, és a jelek finomszerkezete is láthatóvá válik, amely megengedi a csatolási állandók mérését. [112]

A szintén homonukleáris TOCSY technika hasonló a COSY mérésekhez, ám ez spinlock (pulzusszekvencia elem, amely alatt a mágnesezettség az x-y síkban vagy a z tengely mentén tartható) körülmények között zajlik, így a teljes csatoló spinrendszer korrelációt mutat, amíg egy heteroatom/kvaterner szénatom meg nem szakítja azt vagy a közel 0 Hz csatolási állandó miatt lehetetlenné válik a mágnesezettség továbbterjedése. [113] Hasonlóan a COSY kísérlethez, egy 90°-os ¹H gerjesztő pulzus után a mágnesezettség kifejlődik a t₁ várakozási idő alatt. Ám míg a COSY esetén itt a kiolvasópulzus következik, a TOCSY kísérletben egy spinlock blokk szerepel, amely egy izotróp keverést tesz lehetővé. [114] Hosszabb keverési idő alkalmazásával, több kötésen keresztüli korrelációkat detektálhatunk a spinrendszerben. A TOCSY mérés egydimenziós formában is alkalmazható, ekkor egy adott jelet a ¹H spektrumban szelektíven besugárzunk, majd a vele egy spinrendszerben szereplő hidrogénatomok jelei jelennek meg a spektrumban. [115]

A NOESY és ROESY mérés technikák esetén a mágnesezettség átvitele az egyik magról a másikra téren keresztüli, dipól-dipól kölcsönhatásokon keresztül történik. [116] Itt is egy diagonális található a spektrumban, a diagonálison kívül eső korrelációk

mutatják meg az egymással 5 Å térközségen belül elhelyezkedő hidrogénatomokat. Mivel a keresztcsúcsok térfogati integrálja a távolság -6. hatványával arányos, így kvantitatív módon használható az egyes hidrogénatomok térközségének meghatározására. [117] Az 500-600 Da molekulatömeghez közeli molekulák esetén nem használható a NOESY módszer, mivel ebben a tartományban vált előjelet a NOE % érték és az intenzitásváltozás közel 0. Ebben az esetben a ROESY kísérletet alkalmazzuk. A rotációs korrelációs idő a molekulatömeg mellett függ az alaktól és a viszkozitástól is. A kétdimenziós homonukleáris szekvenciákhoz hasonlóan itt is egy 90°-os gerjesztő pulzust alkalmazunk, majd t_1 várakozási idő alatt kifejlődik a mágnesezettség. Itt egy spinlock szekvenciaelem után történik a FID kiolvasása. A NOESY technika esetén a t_1 várakozási idő után egy 90°-os pulzus longitudinális (z-irányú) mágnesezettséget hoz létre, amely a NOE keverési idő alatt dipoláris keresztrelaxáció vagy kémiai kicserélődés által tovaterjed, majd egy újabb 90°-os pulzus után történhet a detektálás. Egyes magok szelektív gerjesztésével létezik egydimenziós NOESY és ROESY kísérlet is, ahol az egydimenziós spektrumban az 5 Å távolságon belüli jelek szenvednek intenzitásváltozást. [118, 119]

A DOSY technikával, mint PFG (pulsed field gradient) technikával a molekulák transzlációs diffúziójának mérésére van lehetőség. [120] Minden molekula rotációs (Brown-mozgást) és transzlációs mozgást (diffúzió) végez, a diffúziós állandó az Einstein-Stokes egyenlettel írható le (2. egyenlet):

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_s} \quad (2)$$

D = diffúziós állandó (m^2/s)

k = Boltzmann-állandó (K/J)

T = hőmérséklet (K)

η = viszkozitás ($\text{Pa}\cdot\text{s}$)

r_s = hidrodinamikai sugár (m).

Amennyiben a vizsgált részecske összemérhető az oldószermolekula hidrodinamikai sugarával, a nevezőben 6 helyett 4-et használunk.

A gradiens segítségével az adott molekula térbeli helyzete meghatározható, majd ha elmozdul a diffúziós idő alatt, ez egy második gradienssel kiolvasható. [121, 122] A jelintenzitás csökken a diffúziós idő, a gradiens erősség és a gradiens hosszának függvényében. Nagyon fontos tényező a gradiens linearitása és állandósága a minta teljes magasságában. Emellett a minta állandó hőmérsékletét is biztosítani kell, ha nem azonos az NMR cső alsó és felső részében a hőmérséklet, egész oldatrészletek elmozdulását generálja (konvekció) és változást okoz a viszkozitásban, ami befolyásolja a mérés eredményét. A pszeudo 2D spektrumban az F2 dimenzióban a ^1H spektrum található, az F1 dimenzióan leolvasható a diffúziós koefficiens. Egy sorban egy molekula/asszociátum jelei jelennek meg. Innen az Einstein-Stokes egyenlettel kifejezhető a hidrodinamikai sugár vagy belső referenciát használva kiszámítható ugyanúgy a hidrodinamikai sugár vagy a molekulatömeg (3. és 4. egyenlet) [123, 124]:

$$\frac{D_s}{D_{\text{ref}}} = \frac{r_{\text{ref}}}{r_s} \quad (3);$$

$$\frac{D_s}{D_{\text{ref}}} = \sqrt[3]{\frac{M_{\text{ref}}}{M_s}} \quad (4)$$

D_s = ismeretlen diffúziós állandója

D_{ref} = belső referencia diffúziós állandója

r_{ref} = belső referencia hidrodinamikai sugara

r_s = ismeretlen hidrodinamikai sugara

M_{ref} = belső referencia molekulatömege

M_s = ismeretlen molekulatömege

NMR vizsgálatok során gyakran szükségessé válhat az oldószerjelek elnyomása, amikor a nem-deuterált oldószermolekulák sokszoros koncentrációban találhatók a vizsgált vegyülethez képest. Peptidek vizsgálata során az amid NH és a deutérium-oxid általi NH – ND cseréjének elkerülésére $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90:10 vagy 95:5 térfogatarányú) elegyét alkalmazzuk, itt a H_2O akár több tíz- vagy százezerszeres mennyiségben lehet jelen a mintában a peptidhez képest. Az oldószerelnyomás legismertebb módszerei a preszaturáció (jelek telítése a kísérlet előtt) vagy a PFG alapú WET [125], a Watergate [126, 127] és az excitation sculpting [128].

Az NMR spektroszkópiában folyamatos újításokat eszközölnek a minél jobb felbontás és nagyobb érzékenység érdekében. Az érzékenység (jel/zaj arány) a következő egyenlettel írható le (5. egyenlet) [117]:

$$\mathbf{Jel/ Zaj} \sim c \gamma_{\text{exc}} \gamma_{\text{det}}^{3/2} B^{3/2} (NS)^{1/2} T_2 T^{-1} (G Q T_c^{-1} c_2^{-1}) \quad (5)$$

c = koncentráció

γ_{exc} =gerjesztett mag giromágneses
állandója

γ_{det} =detektált mag giromágneses
állandója

B =statikus mágneses tér

NS =akkumulációk száma

T_2 =spin-spin relaxációs idő

T =hőmérséklet

G =mérőfejre jellemző állandó

Q =mérőfej jósági faktora

T_c =mérőtekercs hőmérséklete

c_2 =előerősítő zajfaktora

Az egyenletből következően növelhetjük az érzékenységet a koncentráció növelésével, erre, ha nem áll rendelkezésre megfelelő anyagmennyiség, lehetőségünk van speciális Shigemi-csövek és kapilláris mérőcsövek alkalmazásával kisebb térfogatmennyiségben végezni a méréseinket. További mód az akkumulációk számának növelése, amely azonban nagy mértékben növelheti a mérésidőt. Érdekes az érzékenyebb, nagyobb giromágneses állandójú magon gerjesztetni és detektálni. A protondetektálással kapott spektrumokat inverz spektrumoknak is nevezzük régebbi nomenklatura szerint. A hardverben a G és Q faktor a mérőfej kialakításának optimalizálásával növelhető. Szupravezető mágnesek tökéletesítésével egyre nagyobb B statikus mágneses térrel rendelkező készülékeket sikerült gyártani. [129] A héliummal hűtött mérőfej esetében jelentős érzékenységnövekedést érhetünk el az adó- és vevőtekercs, illetve az előerősítő hőmérsékletének csökkentésével. A tekercseket, illetve az előerősítőt héliumgáz segítségével egy zárt hűtési rendszerrel tartják 16 K, illetve 77 K-en. Külön kihívás megfelelő szigetelés megoldása, mivel a hűtött részek és az általunk meghatározott hőmérsékleten (kb. szobahőmérséklet) tartott mintánk között mindössze néhány mm a távolság. Könnyebben és kisebb költségekkel telepíthető a folyékony nitrogén elpárologtatásával hűtött mérőfej (ProdigyTM mérőfej), amely napjainkban szintén széles körben kerül felhasználásra.

A felbontás növelése szintén egy fontos irány az NMR spektrométerek és spektroszkópai módszerek fejlesztésében. Az egyre nagyobb statikus mágneses térerővel bíró készülékek nem csak nagyobb érzékenységgel, hanem nagyobb felbontással is rendelkeznek. HSQC és HMBC spektrumok esetén a zsúfolt tartomány fejtése nehézkes, az elkülönülő jelekhez szükséges a nagyobb felbontás. A digitális felbontást a Hz per pont érték adja meg, tehát az indirekt ^{13}C dimenzióban növelhető a felbontás az inkrementumok számának növelésével vagy a spektrumablak csökkentésével. Az inkrementumok számának növelése nagymértékben növeli a mérésidőt, ezért csak

bizonyos határon belül növelhető. Az indirekt dimenzióban kisebb spektrumtartomány kiválasztása esetén számolnunk kell a tartományon kívül eső jelek visszahajlásával („folding”), amely jelátfedésekkel zavarhatja a spektrumfejtést. Egy másik lehetőség a speciális pulzusszekvenciák alkalmazása. A sávselektív módszerek drámai felbontásnövekedést okoznak az F1 dimenzióban, anélkül, hogy megjelenjenek a visszahajló jelek. A sávselektív HSQC és HMBC pulzusszekvenciákban az egyik 90° -os ^{13}C pulzus helyett egy selektív pulzust alkalmazunk, melyet formázott pulzusokkal valósítjuk meg. [130, 131] A lineáris predikció matematikai módszerekkel szintén növeli a felbontását a felvett spektrumnak: a FID felvett szakasza előtti vagy utáni adatpontok kiszámíthatók. A NUS (non uniform sampling) esetén a többdimenziós mérés t_1 inkrementumaiból egy meghatározott mintázat szerint kihagyunk, majd ezen adatpontokat matematikai módszerekkel helyreállítjuk a feldolgozás során. [132]

1.2.3. ECD spektroszkópia a szerkezeti vizsgálatokban

A CD spektroszkópia által gyorsan, egyszerű mintaelőkészítéssel nyerhető szerkezeti információ, a módszert elsősorban peptidek és fehérjék esetében alkalmazzuk. [133] Kiváló kiegészítője a nagyfelbontású módszereknek, mint az NMR spektroszkópiának és a röntgenkristallográfiának. A vizsgált vegyületnek optikailag aktívak, így a polarizált fény síkját elforgatják. Az optikailag aktív anyag által a két cirkulárisan polarizált fénysugár eltérő mértékben nyelődik el, áthaladás után amplitúdójuk különbözik, ezáltal elliptikusan polarizáltak lesznek. [117] A két fénynyalábra vonatkozó abszorpciós koefficiens különbséget mérjük a hullámhossz függvényében.

A közeli UV tartományban (320 – 250 nm) az elnyelés az aromás oldalláncoktól származik (triptofán, tirozin, fenilalanin), ezek egymáshoz viszonyított helyzete befolyásolja a spektrumot, így a harmadlagos szerkezetről ad felvilágosítást. [134]

A távoli UV tartományban (250–178 nm) az amidkromofórok okoznak abszorbanciát, ezek egymáshoz való térbeli elhelyezkedése befolyásolja a spektrumot, ezáltal a másodlagos szerkezetről nyerhetünk információt. 220 nm körüli sávok a $\pi \rightarrow \pi^*$ átmenet miatt, a 190 nm körüli sávok az $n \rightarrow \pi^*$ átmenet miatt láthatók a spektrumban. [134]

2. Célkitűzések

PhD munkám során mesterséges önrendeződő rendszerek szerkezeti vizsgálata és a rendezett konformáció kialakulásának tanulmányozása volt a cél, elsősorban NMR spektroszkópai módszerekkel.

Első lépésként a megfelelő szerkezetek NMR jelhozzárendeléseit végeztük el. Megtörtént a szerkezetek igazolása és felderítésre kerültek az egyes atomcsoportok a molekulában, amely információt felhasználva ezek relatív helyzetének meghatározása is lehetővé vált a későbbiekben.

A szkvalén-oldalláncot viselő ekdiszteroidok és ezek szabad ekdiszteroidjainak teljes jelhozzárendelését végeztük el, beleértve a diasztereotóp hidrogének megkülönböztetését.

A szkvalén-oldallánc teljes jelhozzárendelésének elkészítése kihívást képező feladat volt. Az ismétlődő szerkezeti egységek egy-egy atomcsoportja nagyon hasonló kémiai környezetben helyezkedik el, így kémiai eltolódásuk is nagyon közel lesz egymáshoz, nehezen megkülönböztethetők; emellett még a szteroid jelekkel is átfedésben találhatók a spektrumban. Ezért célunk volt ennek megoldására a stratégia kidolgozása, felbontást növelő módszerek alkalmazása.

Az ekdiszteroid vegyületek esetén további feladatokkal egészült ki a szerkezetvizsgálat. Az egyik vegyületsorozatban a szteroid molekularész oxim típusú volt, így az *E/Z* izoméria megállapítása is a feladatunk volt. A szteránváz esetén továbbá az A/B gyűrűkapcsolódás meghatározását is célul tűztük ki.

A következő feladatunk a megfejtett szerkezetek leírása után, az önrendeződés vizsgálata volt. A szkvalén-konjugátumok esetén korábbi eredmények alapján egy vizes rendszerben képződő nanoasszociátumot vártunk. Kísérleteinkben szintén NMR spektroszkópai módszereket alkalmaztunk.

A β -peptidek esetén a gerincprotonok jelhozzárendelését írtuk le. Itt is célunk volt az önrendeződés vizsgálata, három különböző oldószerben, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 90:10 térfogatarányú elegyében, CD_3OH -ban és $\text{DMSO}-d_6$ -ban vizsgáltuk a β -aminosavakból felépülő pentamer rendszereket. E munka keretein belül megkülönböztettük a rendezett helikális és a rendezetlen/kis stabilitású rendezett szerkezeteket NMR spektroszkópai és cirkuláris dikroizmus módszerekkel.

3. Módszerek

3.1 NMR spektroszkópiai vizsgálatok

3.1.1 Mintaelőkészítés, felhasznált anyagok

Az ekdiszteroid vegyületek és konjugátumaik esetén 1-5 mg-ot oldottunk a vizsgált vegyületből 0,6 ml deuterált kloroformban. A β -peptidek esetén 4 mM koncentrációban állítottuk elő a vizsgálati oldatokat 0,5 ml térfogatban. A felhasznált NMR oldószerek a következők voltak: CD_3OH , $\text{DMSO-}d_6$ és víz ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 90:10 térfogatarányú elegye). Az NH-ND cserélődés vizsgálatához CD_3OD oldószert használtunk. A szkvalén-ekdiszteroid nanoasszociátum vizsgálatához deuterált acetonban készült törzsoldatból történt meg a vizsgált anyag bejuttatása D_2O -ba, majd az aceton lepárlásával készült a minta, amelyet Shigemi-csőben mértünk. A szkvalén-konjugátum monomer diffúziójának vizsgálatát CD_3OD oldószerben végeztük. A kísérleti oldatokat a szkvalén-konjugátum nanoasszociátumának kivételével mind 5 mm-es NMR-csőben vizsgáltuk.

3.1.2 NMR felvételek

NMR felvételeket kriofejjrel felszerelt Bruker 950/239 MHz, 800/200 MHz és 500/125 MHz, illetve hagyományos mérőfejjel rendelkező 400/100 MHz készülékeken végeztük. Minden kísérlet esetén a pulzusprogramokat a Bruker és a Varian szoftverkönyvtárából használtuk.

Az ekdiszteroid vegyületek és származékaik esetén az 1D spektrumokat 64K adatpontból nyertük. ^1H felvételekhez a 950 MHz térerősségű mérések esetén 7600 Hz, más térerejű mérések esetén 6500 Hz spektrumablak értéket, 64K adatpontot és 32 ismétlést állítottuk be. A ^{13}C felvételek esetén spektrumainkat 128K adatpontból, 64 ismétlés után, 48000 Hz spektrumablakkal nyertük; DEPTQ spektrumokat 64K adatpontból, 64 ismétlésből, 48000 Hz spektrumablak beállításokkal kaptuk. A kétdimenziós mérések esetén a HSQC paraméterek a következők voltak: spektrumablak az F2 dimenzióban: 7000 Hz vagy 7600 Hz (950/239 MHz); 2K x 128 vagy 2K x 4K (950/239 Hz) adatpont ($t_2 \times t_1$). A HMBC méréseket 4000 Hz vagy 7600 Hz (950/239 Hz) F2 spektrumablakkal és 2K x 256 vagy 16K x 8K (950/239 MHz) adatponttal ($t_2 \times$

t_1) vettük fel. A sávselektív HSQC és HMBC méréseket $2K \times 128$ ($t_2 \times t_1$) adatpontból, a spektrumablakot a kérdéses spektrumrészlethez állítva vettük fel. A szelektív 1D ROESY mérések esetén a keverési idő 300 ms volt, 64 ismétlésből és 32K adatpontból nyertük a spektrumokat. A szelektív 1D TOCSY felvételekhez 128K adatpontot, 7600 Hz spektrumablakot és 8 ismétlést alkalmaztunk. Szelektív 1D mérések esetén klasszikus Gauss pulzust tartalmazott a pulzusprogram. A 2D sávselektív HMBC kísérlet esetén az inverzióhoz adiabatikus chirp pulzus, a refókuszáláshoz Q3 pulzus (3 Gauss kaszkádja) szerepelt. A sávselektív 2D HSQC módszer esetén az inverzióhoz adiabatikus chirp pulzust, a refókuszáláshoz adiabatikus chirp pulzust és Q3 pulzust használtunk. A DOSY kísérletekben (ledbpgp2s pulzusprogram) 7500 Hz F2 spektrumablakot állítottunk be, 128 ismétlésből vettük fel a spektrumot a nanoasszociátum esetén, a monomer és a kalibráció esetén 16 ismétlést alkalmaztunk. $32K \times 16$ ($t_2 \times t_1$) adatpontból készült a pszeudo 2D NMR mérés, a gradienshossz (δ) 1,5 – 2,0 ms, a diffúziós idő (Δ) 100 – 200 ms volt. A gradienserősséget 2-98% között változtattuk lineáris skálán. A maximális gradiens erősség 5,35 G/mm a használt készüléken. A kalibrációhoz metanol-víz elegyet használtunk. A DOSY felvételeket 300,0 K hőmérsékleten végeztük, a hőmérséklet-ingadozás 0,1 K-en belül volt.

A β -peptidekkel végzett kísérletek során az 1H felvételeket 64 ismétlésből és 12000 Hz spektrumablakkal vettük fel 64K adatpontból. A 2D TOCSY kísérletekhez 80 vagy 120 ms keverési időt, 32 ismétlést, 7200 Hz spektrumablakot és $2K \times 256$ ($t_2 \times t_1$) adatpont felvételét állítottuk be. A 2D ROESY mérésekhez 300 vagy 400 ms keverési időt, 32 ismétlést, 7200 Hz spektrumablakot és $2K \times 256$ ($t_2 \times t_1$) adatpontot alkalmaztunk. A 2D COSY méréseket 16 ismétlésből, 7200 Hz spektrumablakkal és $2K \times 256$ ($t_2 \times t_1$) adatpontból vettük fel. Az oldószerjel elnyomásához gradiens vízelnyomási szekvenciát használtunk: p3919gp (water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients [127, 135]) és zgesp (water suppression using excitation sculpting with gradients [128]).

3.1.3 NMR felvételek feldolgozása

A spektrumokat a TopSpin 3.5 szoftverrel dolgoztuk fel. A kémiai eltolódás értékeket δ skálán adtuk meg, referenciaként a maradék oldószerjelet használva: $CDCl_3$: 1H : $\delta = 7,27$ ppm; ^{13}C : $\delta = 77,00$ ppm; DMSO- d_6 : 1H : $\delta = 2,50$ ppm; CD_3OD/CD_3OH : 1H : $\delta = 3,31$ ppm; D_2O : 1H : $\delta = 4,79$ ppm. Az 1D spektrumok elemzéséhez a kémiai

eltolódások általános tudásanyagát és a ^1H spektrumok esetén a proton-proton csatolási mintázatokat használtuk fel. Az egy- és kétdimenziós spektrumok elemzésével készítettük el a teljes jelhozzárendeléseket széles körben elismert stratégiák alapján [136, 137].

3.2 ECD spektroszkópai vizsgálatok

3.2.1 Mintaelőkészítés, felhasznált anyagok

A vizsgálati oldatok 1 mM koncentrációban tartalmazták a felhasznált vegyületeket metanolban és vízben. A méréseket 0,1 cm vastagságú cilindrikus kvarcküvetében végeztük. A háttér felvételéhez a tiszta oldószert alkalmaztuk.

3.2.1 ECD felvételek

A CD felvételekhez Jasco J-1500 spektropolarimétert használtunk, méréseinket 298K hőmérsékleten végeztük. Minden spektrumfelvételt háromszor ismételtünk meg.

3.2.2 ECD felvételek feldolgozása

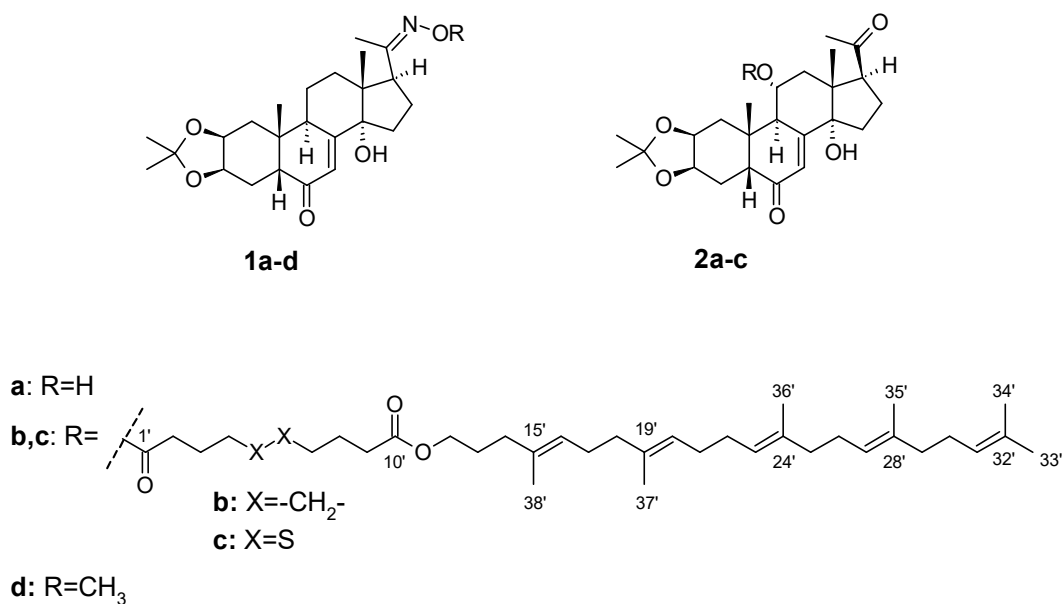
Minden CD görbét az adott oldószer referenciamintájával korrigáltunk. A feldolgozást a Jasco Spectra Manager szoftverével végeztük el.

4. Eredmények

4.1 Ekdiszteroid vegyületek és szkvalén konjugátumaik szerkezetvizsgálata

4.1.1. Szerkezetigazolás, teljes ^1H és ^{13}C jelhozzárendelés elkészítése

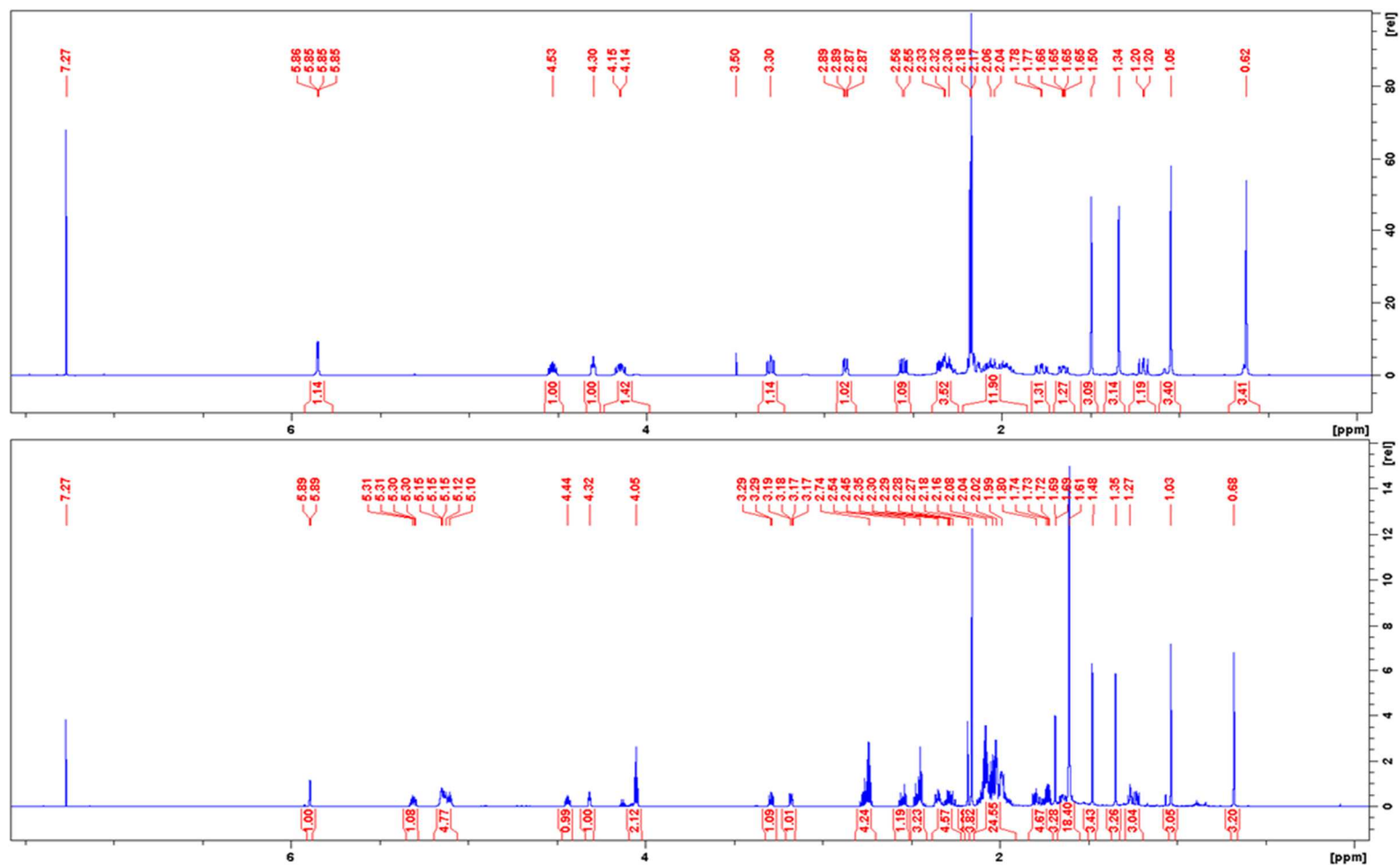
Értekezésemben két ekdiszteroid vegyület és ezek két-két különböző oldallánccal módosított származékainak vizsgálatát tárgyalom. (18. ábra) Először áttekintem az ^1H és ^{13}C spektrumok megjelenését, ezek egyes tartományait minden vizsgált vegyületre vonatkozóan. Ezt követően az egyik származékot fogom példaként használni, ezen keresztül mutatom be a teljes jelhozzárendelés elkészítését és a szerkezet egyértelmű igazolását részleteiben. A vegyületcsoport további tagjait is hasonló módon fejtettük meg, természetesen figyelembe véve az ott szereplő szerkezeti eltéréseket, egy-egy fontosabb részletet ezekben az esetekben is tárgyalok.



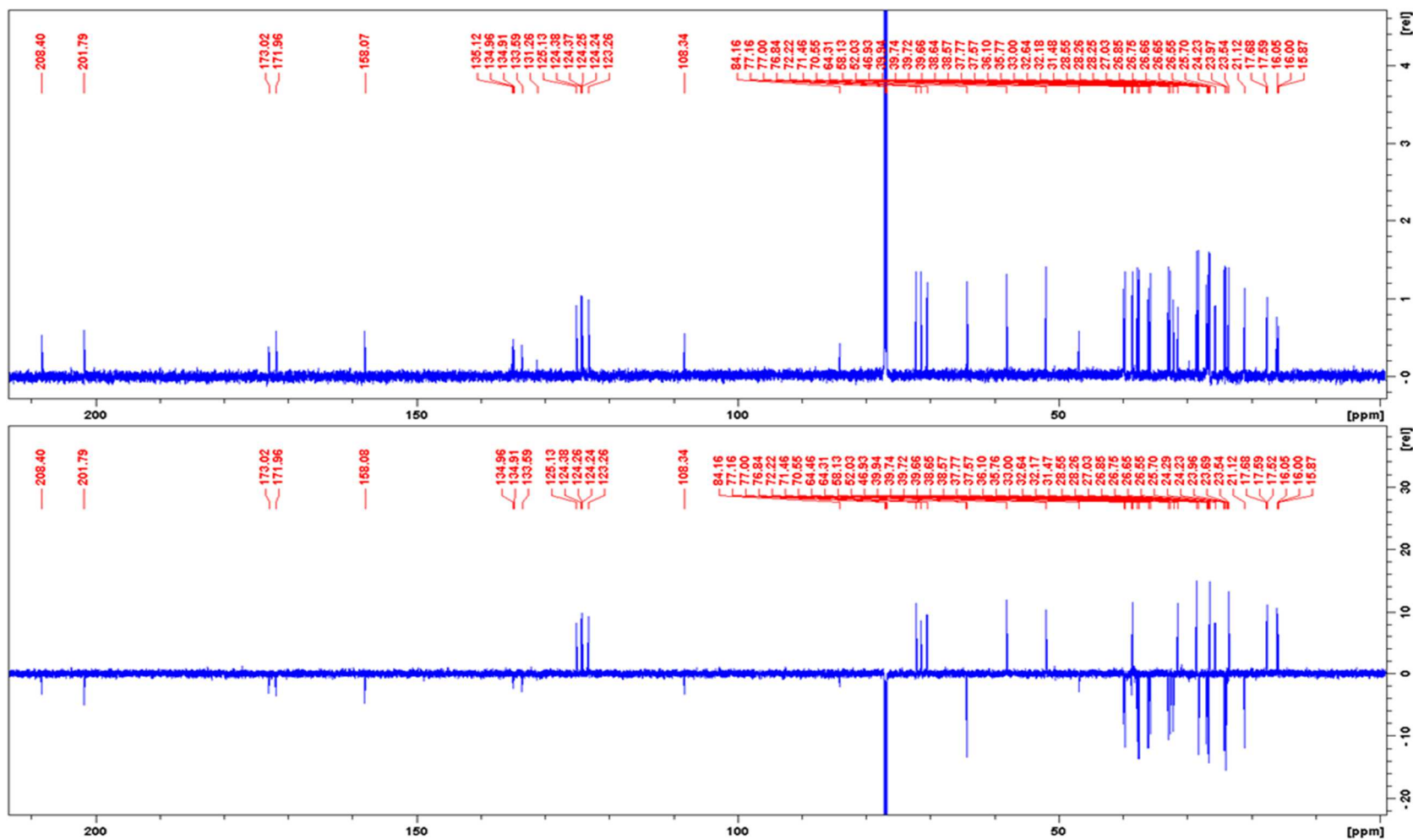
18. Ábra: A vizsgált vegyületek szerkezetei

A vegyületek ^1H spektrumát megfigyelve, 2,8 – 0 ppm régióban számos jelátfedéssel találkozhatunk. Itt találhatók a metil hidrogének, a legtöbb $\text{sp}^3 \text{CH}_2$ és CH csoport hidrogénatomjai is; a szkvalén-konjugátumok esetén a szkvalén- és linkeregység CH_2 csoportjai, illetve a szkvalén metilek is itt adnak jeleket. Ebben a komplex tartományban az egyes jelek az ^1H spektrumban még külön-külön nem fejthetők. 2,8

ppm-nél magasabb kémiai eltolódással jellemezhető hidrogénatomok esetén a jelátfedés nem áll fenn, már jellemezhetők a ^1H spektrum alapján meghatározott multiplicitással és csatolási állandóval. Itt jelentkeztek az sp^2 hibridizációjú CH hidrogének (H-7), a heteroatommal (esetünkben oxigénatom) vagy karbonilcsoporttal/oximcsoporttal szomszédos CH hidrogének (H-2,3; H-17) és néhány további CH hidrogén (H-9,17). Ha a szkvalén-linker láncot is tartalmazta a molekula, az innen származó H-12' oxigénatom melletti CH_2 hidrogének jelentek meg 4 ppm körüli értékkel és a diszulfidhidat tartalmazó linkert viselő vegyületek esetén a kénatommal szomszédos CH_2 csoportok hidrogénjei is itt rezonáltak. 5 ppm felett adtak jelet a szkvalén molekularész sp^2 CH csoportjai is, ám ezek között is jelentős átfedés volt tapasztalható, az 5 hidrogénatom egy nagy átfedő multiplettben jelentkezett. A 2,8 – 0 ppm régióban is voltak jelek, amelyek jól detektálhatók voltak a jelátfedések ellenére is, az éles szingulett metiljelek kiemelkedtek és egyértelműen azonosíthatók voltak. A szkvalén egység metiljelei szinte teljes átfedésben jelentkeztek 1,61 vagy 1,60 ppm-nél, H-33' kivételével, amely elkülönült jelet adott 1,68 vagy 1,69 ppm értéknél. (19. ábra)

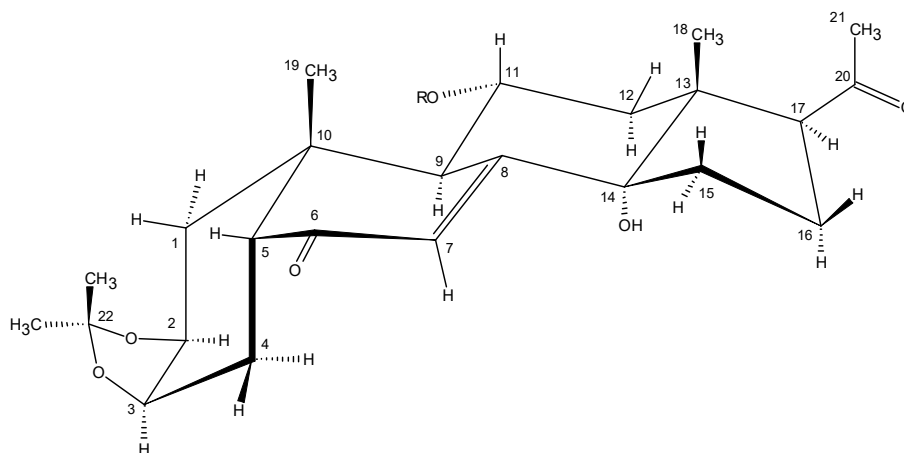
19. Ábra: **2a** (fent, 500 MHz) és **2c** (lent, 800 MHz) ^1H NMR spektruma

A vegyületek ^{13}C spektrumainak felvételéhez szélessávú ^1H -lecsatolt ^{13}C felvételeket és DEPTQ méréseket végeztünk. A ^{13}C spektrumban a legmagasabb kémiai eltolódásértéket a karbonil ^{13}C atomok szolgáltatták, 201,8 és 209,0 ppm között, a **2a** és származékai esetén két, az **1a** és származékai esetén egy ilyen szénatomot azonosíthattunk. Az előzőknél kisebb kémiai eltolódás értékeknél a szkvalén-linker egységet tartalmazó származékok a két észtercsoportra jellemző kémiai eltolódást mutatták 170,7 és 173,9 ppm között. Majd a C-8 sp^2 ^{13}C atom azonosítható 158,1 – 162,5 ppm között az egyes vegyületekben, amelyek pedig oximcsoportot tartalmaztak, a C-20 ^{13}C atom 156,4 – 166,1 ppm kémiai eltolódás érték között jelent meg. A szkvalén egység kvaterner sp^2 ^{13}C atomjai 131,2 – 135,1 ppm között szolgáltattak jelet, nagyon közeli kémiai eltolódás értékekkel voltak jellemezhetőek. A szkvalén rész további sp^2 hibridizációjú CH csoportjai szintén egy szűk tartományban, 124,2 – 125,1 ppm között azonosíthatók. Ezután a szteroid C-7 adott jelet a spektrumban 121,4 – 123,3 ppm között. Minden más jeltől jól elkülönült és 108,2 vagy 108,3 ppm értékkel volt jellemezhető a C-22 ^{13}C atom, az acetonid molekularész kvaterner szénatomja. A C-14 egy kvaterner szénatom hidroxilcsoport mellett, 84,1 – 84,5 közti értékeket mértünk kémiai eltolódásként. Szintén oxigénatom mellett helyezkednek el a szteránváz C-2,3 ^{13}C atomjai, kémiai eltolódásuk 71,5 – 72,6 ppm között azonosítható. **2a** esetén C-11 szénatomhoz OH kapcsolódik (67,9 ppm), illetve a két származék esetén itt történt az észterképzés, így ez a ^{13}C atom ebben az esetben 70,2 és 70,5 ppm-es értéket adott. A szkvalén egység C-12' ^{13}C atomja 64,3 vagy 64,0 ppm kémiai eltolódás értéknél található. A szteránváz C-5,13,17 ^{13}C atomjai helyezkednek el a 46,9 – 58,2 ppm-es tartományban. 40 ppm alatt váltak igazán zsúfolttá a vegyületek ^{13}C spektrumai, a szteránváz korábban nem említett CH és CH_2 csoportjai, a szkvalén-linker régió metilénecsoportjai C-12' kivételével és a vegyületek metilcsoportjai helyezkednek el ebben a kémiai eltolódás tartományban. (20. ábra)



20. Ábra: **2c** ^{13}C (fent, 800 MHz) és DEPTQ (lent, 800 MHz) spektruma

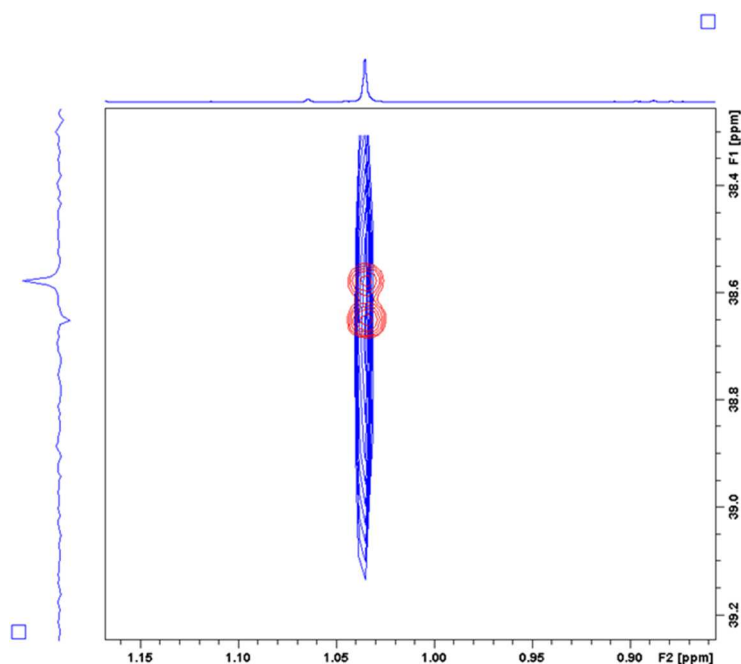
4.1.1.1. A szteroid molekularészek teljes ^1H és ^{13}C jelhozzárendelésének elkészítése



21. Ábra: A **2a** és származékai szteroid molekularészének szerkezete és a vegyületek számozása; B gyűrű torzult szék konformációban a karbonil csoport és a kettőskötés miatt

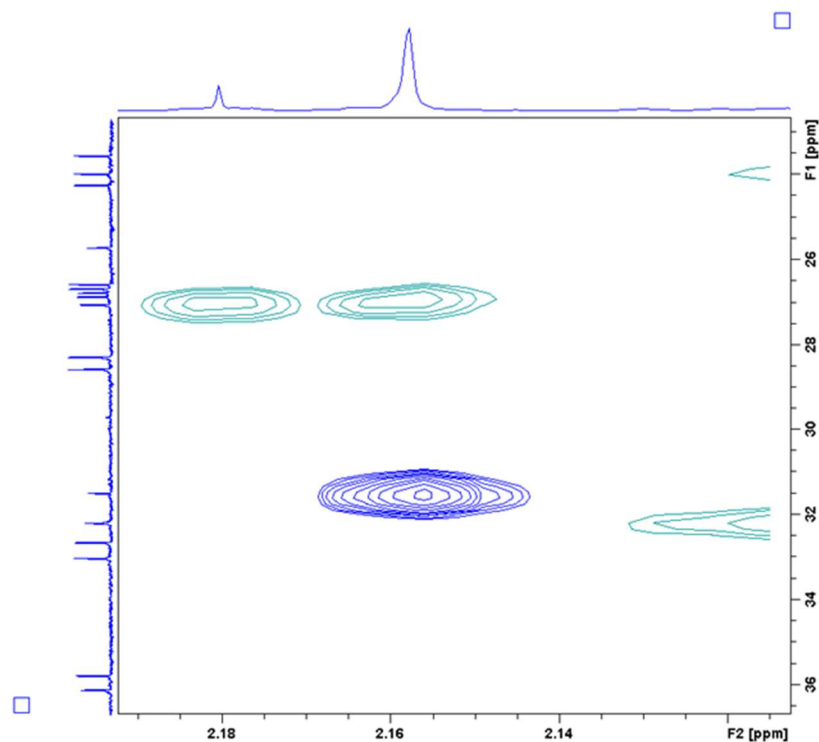
A következőkben a **2c** vegyületen mutatom be a szerkezetfelderítés menetét. A vegyületek számozásánál a hagyományos szteroid-számozást követtük. (21. ábra) A jelhozzárendelés kiindulópontja a CH-7 csoport azonosítása lehet. A 123,3/5,89 ppm-es kémiai eltolódás érték egyértelműen egy ilyen típusú csoporthoz tartozik. A DEPTQ és az editált HSQC spektrum is megerősítette a CH csoportként való azonosítást a pozitív fázisban való megjelenéssel. A jel dublett-dublett szerkezete is jól leolvasható 2,9 és 0,7 Hz csatolási állandókkal. A H-7 atomról HMBC korrelációval eljutunk a 3,18/38,6 ppm, 2,35/52,0 ppm CH csoportokhoz és 84,2 ppm kvaterner szénatomhoz. Így 84,2 ppm mint C-14 került azonosításra, 2,35/52,0 ppm kémiai eltolódásértékek pedig mint a karbonilcsoporttal szomszédos CH-5, majd 3,18/38,6 ppm a CH-9-ként. Ezt a hozzárendelést megerősíti és újabb információt szolgáltat a CH-9 HMBC korrelációja CH₃-19-hez (1,03/23,5 ppm). CH₃-19 csak egyetlen CH₂-t jelölhet ki HMBC spektrumban, így a CH₂-1 1,23 & 1,80/39,9 ppm-hez rendelhető. CH₃-19-ről detektálható volt két kötésen keresztüli korrelációval a C-10 kvaterner szénatom (38,6 ppm). Ez a korreláció egy összeolvadt jelként jelentkezett a HMBC spektrumban, azonban a sávselektív HMBC felvételekkel egyértelműen két külön korrelációként azonosítható CH₃-19/C-10 és CH₃-19/CH-9. (22. ábra) A két szénatom között különbség csak a századértékek megadásával tehető: C-10: 38,64 ppm és C-9: 38,57 ppm. C-10-ről azonosítható H-4 (2,17 ppm), majd ehhez hozzárendelhető az editált sávselektív HSQC

spektrum alapján C-4 (27,0 ppm) és a csoport másik diasztereotóp hidrogénje (1,78 ppm). C-5 kijelölte H-3-t, $\delta = 4,32$ ppm (ddd; $J = 4,8; 4,8; 1,4$ Hz), a hozzá tartozó C-3 HSQC alapján 71,5 ppm. CH-3 és CH-2 (4,44 ppm (ddd; $J = 10,6; 6,0; 4,8$ Hz) között is HMBC keresztcsúcs figyelhető meg. Mindkét atomcsoport kijelöli a kvaterner C-22-t (108,3 ppm). Ehhez a szénatomhoz két metilcsoport kapcsolódik: CH₃- β -22: 1,48/28,5 ppm és CH₃- α -22: 1,35/26,6 ppm.



22. Ábra: **2c** HMBC (kék) és sávselektív HMBC spektrum (piros) CH₃-19/C-10 és CH₃-19/CH-9 korrelációkkal; 800 MHz

Két 200 ppm feletti eltolódás azonosítható, 201,8 ppm és 208,4 ppm. A kisebb kémiai eltolódású ¹³C tartozik a szteránváz B gyűrűjének karbonil csoportjához, mivel a kettőskötéssel való konjugáció diamágneses eltolódást okoz. Megvizsgálva a két $\delta C=O$ HMBC korrelációit, csak a 208,4 ppm-es jel adott egy metilcsoporttal (2,16 ppm) korrelációt, így ezt a kvaterner szénatomot azonosíthattuk C-20-ként, a metilcsoportot pedig CH₃-21-ként (2,16/31,47 ppm). A metilcsoportként való azonosításban az editált HSQC és a DEPTQ spektrum volt a segítségünk, a metiljel átfedésben található a ¹H spektrumban egy CH₂ csoport egy hidrogénjével (H-4) 4H integrált intenzitásértéket adva. (23. ábra) A második 200 ppm feletti kémiai eltolódás 201,8 ppm-nél a C-6 atomhoz párosítható, amelyet további HMBC korrelációk is megerősítettek.



23. Ábra: **2c** editált HSQC spektrum: 2,16 ppm ^1H jelben átfedésben CH_3 -21 és CH_2 -4 egyik diasztereotóp hidrogénje; 800 MHz

C-10 utolsó, eddig fel nem használt korrelációja H-11-hez vezet (5,31 ppm; C-11: 70,5 ppm). **2b** vegyület esetén, amely szintén egy szkvalén-linker oldallánccal rendelkező molekula, csaknem azonos kémiai eltolódást azonosítottunk: 5,30/70,2 ppm; míg a szabad hidroxilcsoporttal rendelkező ekdiszteroid (**2a**) esetén CH-11 4,15/67,9 ppm kémiai eltolódásnál jelentkezett. **1a-d** itt egy metilén-csoportot tartalmazott, a két diasztereotóp hidrogén 1,61 és 1,78 – 1,80 ppm értéknél, a hozzájuk tartozó C-11 pedig mindhárom esetben 20,6 ppm-nél jelentkezett.

A B gyűrű utolsó hiányzó kvaterner szénatomját, C-8-at (158,1 ppm) egyértelműen kijelölte két kötésen keresztüli korrelációval H-9. A C és D gyűrűk megfejtésével folytatva, a korábban meghatározott C-14 szénatomról kiindulva 3 kötésen keresztüli korrelációt ad CH_3 -18 (0,62/17,8 ppm). Innen H-18-ról keresztcsúcsot ad C-12 (36,1 ppm), C-13 (46,9 ppm) és C-17 (58,1 ppm). Az editált sávselektív HSQC spektrumokkal megadtuk a kapcsolódó hidrogénatomokat is: a két diasztereotóp H-12 2,28 és 2,26 ppm-nél, a H-17 3,29 ppm-nél jelentkezett.

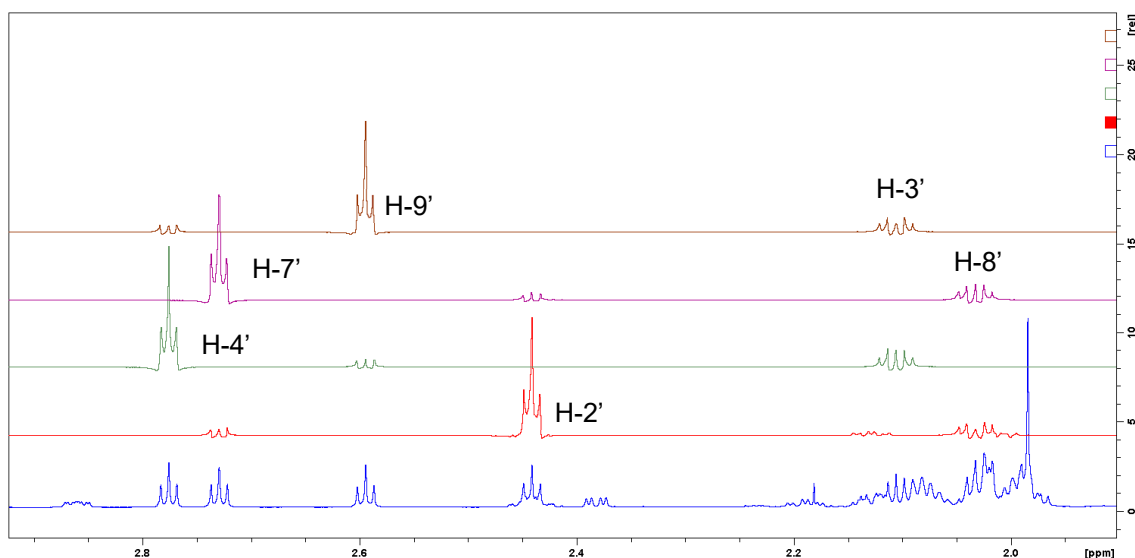
A karbonil C-20 kijelölte a CH₂-16 egyik diasztereotóp hidrogénjét (2,34 ppm), majd ehhez társítottuk a sávselektív editált HSQC spektrum alapján C-16-ot (21,12 ppm) és a hiányzó másik diasztereotóp hidrogént (1,95 ppm). A kvaterner C-13 korrelációt adott H-15 és H-16 hidrogénekhez is, az előzőekben azonosított H-16 adatok alapján ez kizárásra kerülhetett és CH₂-15 (2,11 & 1,65/32,17 ppm) is leírható a HMBC és sávselektív editált HSQC mérések alapján. Az egyes vegyületek részletes jelhozzárendelését az 1. Táblázat tartalmazza.

Táblázat 1. A Szteroid molekularészek jelhozzárendelése CDCl₃-ban; kémiai eltolódás értékek ppm-ben, csatolási állandók Hz-ben

	1a		1d (1d Z)		1b		1c		2a		2b		2c	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1β α	1,26 1,98	37,58	1,25 1,97	37,59	1,26 1,97	37,58	1,27 m 1,98 m	37,61	1,20 2,55	39,97	1,21 1,83	39,88	1,23 1,80	39,94
2	4,25	72,10	4,25	72,10	4,25	72,08	4,25ddd 10,0;6,0;4,7	72,10	4,53	72,59	4,44	72,26	4,44	72,21
3	4,29	71,55	4,29	71,56	4,29	71,54	4,29ddd 4,7;4,7;2,3	71,55	4,30	71,53	4,31	71,48	4,32	71,46
4β α	2,11 1,83	26,64	2,11 1,83	26,65	2,11 1,83	26,63	2,13 m 1,83ddd 15,3;12,5;4,7	26,66	2,15 1,78	27,09	2,15 1,78	27,07	2,17 1,78	27,03
5	2,37	50,81	2,37	50,83	2,37	50,81	2,38dd 12,5;4,7	50,82	2,35	52,12	2,35	52,07	2,35	52,03
6	-	202,65	-	202,72	-	202,55	-	202,42	-	202,91	-	201,90	-	201,79
7	5,85	121,49	5,84	121,37	5,84	121,63	5,86d 2,6	121,69	5,85	122,70	5,89	123,22	5,89	123,26
8	-	162,15	-	162,45	-	161,91	-	161,73	-	159,64	-	158,22	-	158,07
9	2,86	34,60	2,85	34,61	2,86	34,54	2,86ddd 11,7;7,0;2,6	34,60	2,88	41,87	3,18	38,59	3,18	38,57
10	-	37,83	-	37,84	-	37,83	-	37,84	-	38,65	-	38,63	-	38,64
11β α	1,61 1,80	20,59	1,61 1,78	20,61	1,61 1,79	20,57	1,61 m 1,80 m	20,60	4,15	67,93	5,30 -	70,21	5,31 -	70,55
12β α	1,66 2,17	29,85	1,66 2,14	29,89	1,69 2,19	29,87	1,70 m 2,19ddd 13,0;13,0;4,9	29,90	2,18 2,32	40,99	2,29 2,25	36,11	2,30 2,25	36,10
13	-	48,05	-	47,71	-	48,06	-	48,08	-	47,15	-	46,95	-	46,93
14	-	84,38	-	84,47	-	84,33	-	84,39	-	84,13	-	84,20	-	84,16
15β α	2,10 1,60	32,04	2,08 1,57	32,00	2,08 1,57	32,01	2,13 m 1,61 m	32,08	2,07 1,65	32,09	2,10 1,65	32,15	2,11 1,65	32,17
16β α	2,30 1,94	21,24	2,35 1,89	21,17	2,44 1,99	21,30	2,44 m 2,00 m	21,35	2,30 1,98	21,23	2,33 1,93	21,10	2,34 1,95	21,12
17	3,11	51,33	3,04	51,35	3,21	51,94	3,21dd 9,0;9,0	51,95	3,30	58,19	3,29	58,18	3,29	58,12
18	0,63	17,20	0,63 (0,69)	17,18 (18,26)	0,69	17,33	0,70 s	17,36	0,62	17,79	0,68	17,60	0,68	17,59
19	0,99	23,60	0,99 (0,86)	23,60 (23,60)	0,99	23,58	1,00 s	23,60	1,05	23,61	1,03	23,55	1,04	23,54
20	-	158,53	-	156,40	-	165,94	-	166,08	-	209,04	-	208,39	-	208,40
21	1,92	15,53	1,83 (1,92)	16,02 (20,26)	1,83	17,44	1,98 s	17,48	2,17	31,32	2,15	31,44	2,16	31,47
22	-	108,32	-	108,29	-	108,33	-	108,33	-	108,16	-	108,28	-	108,34
Meβ-22	1,50	28,53	1,50	28,52	1,50	28,52	1,51 s	28,53	1,50	28,55	1,47	28,54	1,48	28,54
Meα-22	1,34	26,44	1,34	26,44	1,34	26,43	1,35 s	26,44	1,34	26,56	1,34	26,57	1,35	26,55
MeO	-	-	3,85 (3,87)	61,32 (61,53)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4.1.1.2. A szkvalén-linker oldalláncok teljes ^1H és ^{13}C jelhozzárendelésének elkészítése

CH-11-ről vezető HMBC korreláció segítségével megkülönböztethető a két észter szénatom (172,0 és 173,0 ppm), C-1', mint 172,0 ppm került leírásra, C-10' 173,0 ppm-mel, amely hozzárendelést megerősítette a C-12'-vel (4,05 triplett/64,31 ppm) való korreláció. A szkvalén egység és a szteroid váz között elhelyezkedő linker régió kétféleképpen épül fel. **1b**, **2b** esetén nyolc metilénegység alkotta ezt az összekötő láncot, a **1c**, **2c** vegyületekben pedig egy diszulfidhidat tartalmazott három-három metilénecsoporthoz ékelődve. Mindkét esetben az egydimenziós szelektív TOCSY NMR módszerrel térképeztük fel az oldallánc ezen részét. **1b** vegyület esetében a H-9' jelét (2,29 ppm, C-10'-ről meghatározva) besugározva 120 ms-os keverési idő mellett H-2' és H-3' jele alig észlelhető intenzitással jelentkezett, ám a keverési időt megnövelve a következő kísérletben 200 ms-ra azt eredményezte, hogy a két karbonil szénatom között detektálhatóvá vált a mágnesezettség tovaterjedése H-2' és H-9' közötti teljes alifás egységen. H-4'-7' közötti metilénecsoporthoz kémiai eltolódása olyan közelinek adódott, hogy ezeket egy intervallummal jellemezzük. **1c**, **2c** vegyület esetén a diszulfidhíd két oldalán elhelyezkedő láncszakaszokat külön-külön fejtettük egydimenziós TOCSY NMR kísérletekkel. Mind a H-2' jel, mind a H-4' jel besugárzásával a H-2'-H-3'-H-4' spinrendszert követhettük végig; majd a H-7' és H-9' jelek besugárzásával készült kísérletek kijelölték H-7'-H-8'-H-9' spinrendszert. **2c** esetén a H-2' és H-9' csak együttesen volt besugározható, ebben a kísérletben mindkét hidrogénnel egy spinrendszerben szereplő atomok jelei megjelentek. A 24. Ábrán az **1c** vegyület szelektív 1D TOCSY kísérleteit mutatom be, amely esetben a linker régióban négy jel is szelektíven besugározható volt.

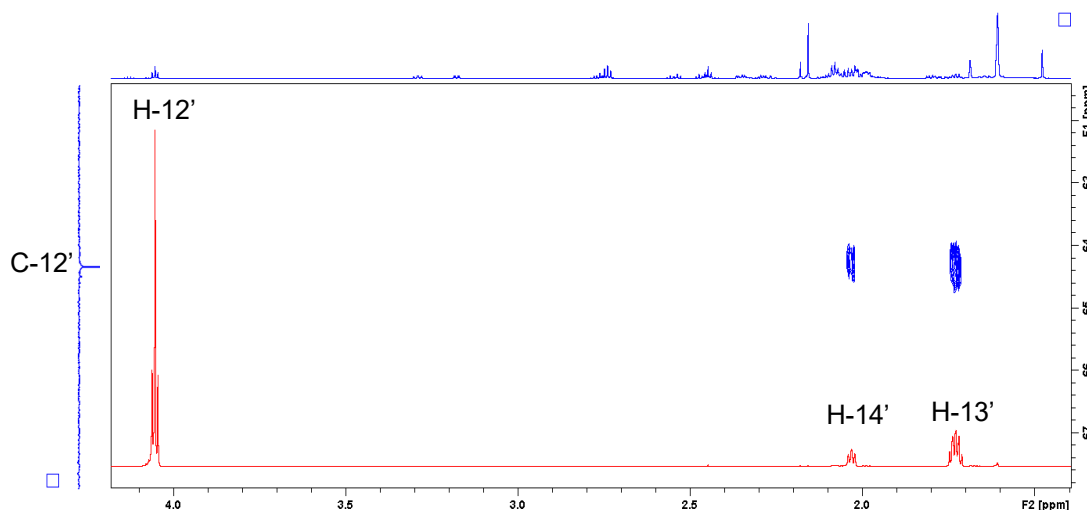


24. Ábra: **1c** 1D szelektív TOCSY spektrumok

kék: ^1H NMR spektrum; piros: H-2' gerjesztése; zöld: H-4' gerjesztése;

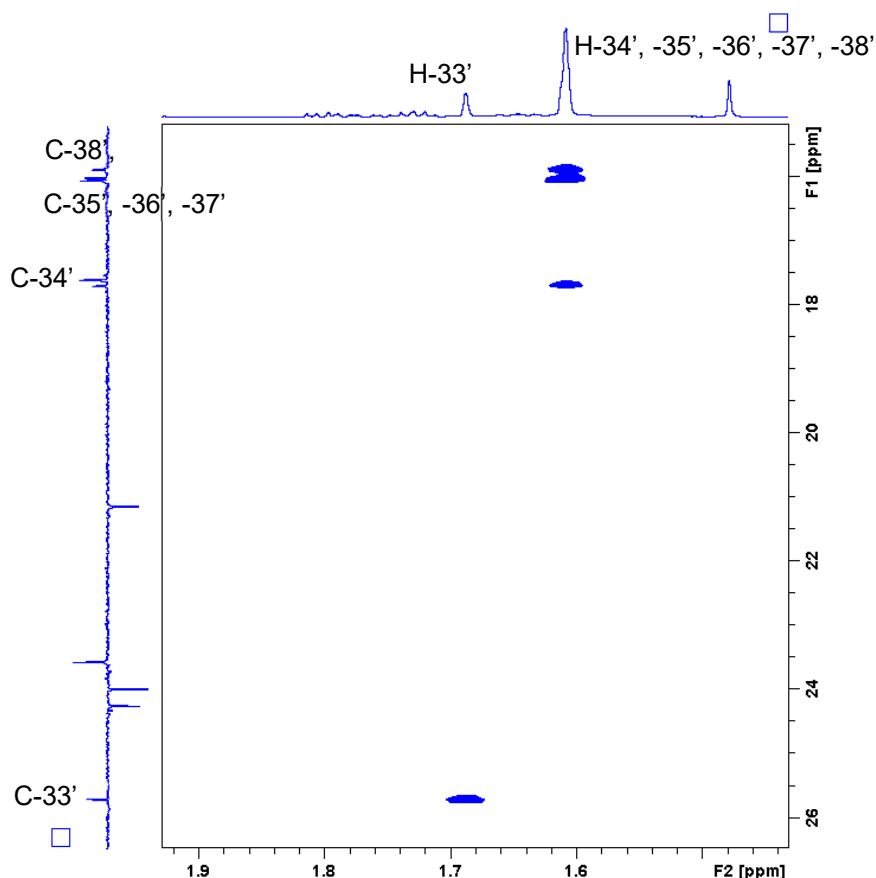
lila: H-7' gerjesztése; barna: H-9' gerjesztése; 950 MHz

Ismét az egydimenziós szelektív TOCSY NMR módszerrel rendeltük hozzá a 12'-13'-14' metilénsoportokat, ezúttal a H-12' (4,05 ppm) jelet besugározva. (25. ábra) Kétdimenziós HMBC spektrumban H-13' és H-14' keresztcsúcsot adott C-15' kvaterner szénatommal (133,6 ppm). C-15' ^{13}C jelhez vezet egy harmadik keresztcsúcs, amely kijelöli H-17' metilénsoportot (2,08 ppm). H-14'-ből (2,03 ppm) kiindulva H-14'/C-16' keresztcsúccsal hozzárendeltük az sp^2 szénatom kémiai eltolódását 16' pozícióban (5,14 ppm), majd erről a ^{13}C atomról szintén HMBC korrelációként H-18' kémiai eltolódását (1,98 ppm) kapjuk meg. Mind H-17', mind H-18' kijelöli C-19' kvaterner szénatomot (135,1 ppm) a HMBC spektrumban, majd C-19' jel keresztcsúcsot ad még egy metilénsoporttal, amely H-21' (2,02 ppm). A H-21' korrelációját az editált HSQC spektrumban jobban megvizsgálva és térfogati integrálját elemezve azt kaptuk, hogy 4 hidrogénhez (2 db CH_2 csoporthoz) tartozik, a kapcsolódó ^{13}C jelek pedig nagyon közeliak (2,02 ppm). Így CH_2 -21' mellett a CH_2 -22' is ebben a keresztcsúcsban található az editált HSQC spektrumban. H-22' HMBC korrelációt adott C-24' kvaterner szénatomhoz (135,0 ppm), majd innen továbbfejthető a jelhozzárendelés H-25' jelhez (1,99 ppm).



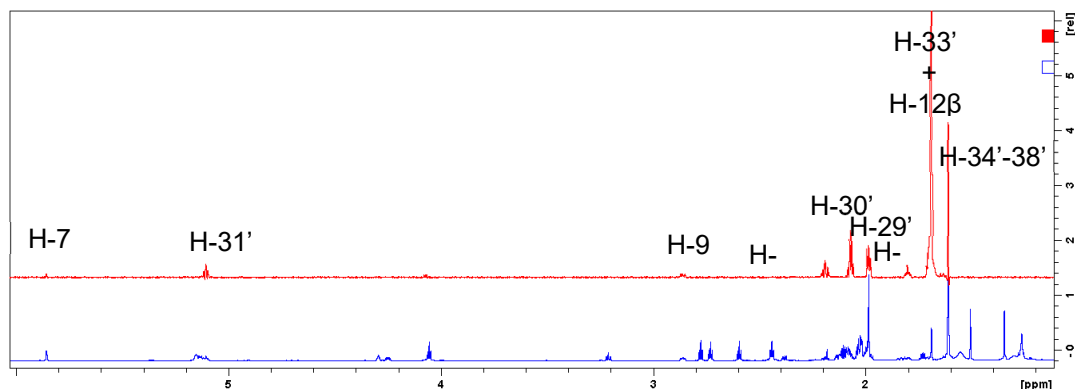
25. Ábra: **2c** HMBC és 1D szelektív ROESY spektruma; 800 MHz
(besugárzott jel: H-12')

Az oldallánc hat metilcsoportot tartalmaz, az ^1H spektrumban ebből öt egyben jelentkezik átfedésben, a hatodik jól elkülönülten azonosítható mind az ^1H , mind a ^{13}C spektrumban, mint kvartett jel (csatolási állandó kb. 1 Hz). (26. ábra) HMBC spektrumban a nagyobb kémiai eltolódású metiljel ($\text{H}_3\text{-33}'$) a 17,68 ppm kémiai eltolódású ^{13}C jellel (C-34') ad keresztcsúcsot, így ez a két metilcsoport geminálisan található az oldallánc végén. Ezen csoportok megkülönböztetése a γ -gauche effektus alapján lehetséges: ez a jelenség a C-30' pozícióban levő metilencsoporttal lép fel és ez alapján C-33' a nagyobb, C-34' a kisebb kémiai eltolódásnál jelentkező ^{13}C atom. C35'-38' kémiai eltolódások az ultranagy térerejű készülékeken készült mérésekkel és sávselektív módszerekkel kerültek meghatározásra.



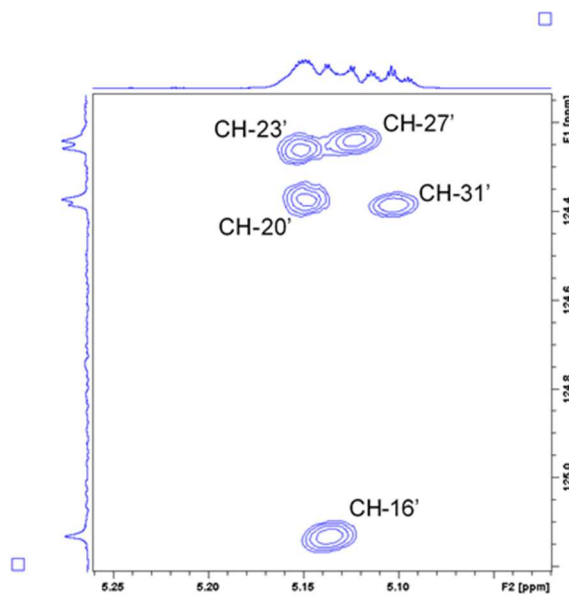
26. Ábra: **2c** sávszelektív HMBC spektruma a metilcsoportok jeleinek tartományával;
800 MHz

Egydimenziós szelektív TOCSY NMR módszert alkalmazva, H-33' metiljelet besugározva, a spektrumban H-34', H-31', H-30' és H-29' azonosíthatók. (27. ábra) Sajnos ebben az esetben a TOCSY módszert nem lehetett teljesen szelektíven kivitelezni, mert a szteránváz H-12 β jele H-33' jellel azonos kémiai eltolódásnál jelentkezik, így ezzel a metilén hidrogénnel azonos spinrendszerben található hidrogénatomok jelei is megjelentek a spektrumban. Ezeket a jeleket már korábban meghatároztuk, így figyelmen kívül hagyhattuk a TOCSY spektrum elemzésénél.



27. Ábra: **1c** 1D szelektív TOCSY $H-33'$ (+ $H-12\beta$) gerjesztésével; 950 MHz

A ^{13}C spektrum jelei közül egyetlen jel maradt, ezt a $\text{C}-28'$ pozícióhoz rendeltük (134,9 ppm). A hozzárendelést megerősítették a HMBC spektrum keresztcsúcsai is: $\text{H}-30'$, $\text{H}-29'$ és $\text{H}-26'$ jelektől. A $\text{C}35'-38'$ kémiai eltolódások az ultranagy térerejű mérésekkel és sávszelektív módszerekkel kerültek meghatározásra. Az sp^2 hibridizációjú CH jelek, és terpénegységek ismétlődő metilénsoportjai szintén az elérhető legnagyobb felbontású spektrumokat igényelték a nagyon közel elhelyezkedő kémiai eltolódás értékek miatt. (28. ábra) Az egyes vegyületek szkvalén-linker oldalláncának jelhozzárendelését a 2. Táblázat tartalmazza.



28. Ábra: **2c** sávszelektív HSQC spektruma a szkvalén egységek sp^2 CH csoportjainak tartományával; 800 MHz

2. Táblázat: A szkvalén-linker oldallánc jelhozzárendelése CDCl_3 -ban;
 kémiai eltolódás értékek ppm-ben

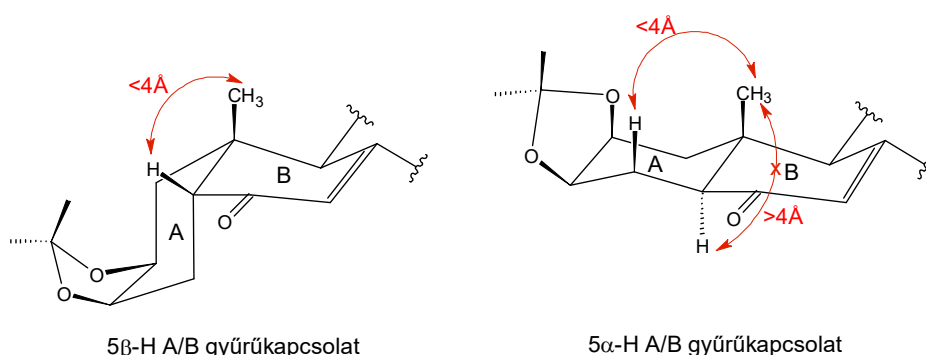
	1b		1c		2b		2c	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1'	-	171,43	-	170,73	-	172,83	-	170,96
2'	2,43	33,00	2,59	31,19	2,36	34,66	2,55 2,46	33,00
3'	1,68	24,81	2,11	23,96	1,66	24,64	2,08	23,96
4'	1,41- 1,27	29,08	2,78	37,62	1,34	29,03	2,76	37,57
5'		29,08	-	-	1,36-	29,07*	-	-
6'		29,08	-	-	1,31	29,08*	-	-
7'		29,08	2,73	37,78	1,33	29,10	2,74	37,77
8'	1,61	24,94	2,03	24,22	1,63	24,96	2,04	24,23
9'	2,29	34,32	2,44	32,62	2,30	34,34	2,45	32,64
10'	-	173,91	-	172,95	-	173,92	-	173,02
11'	-	-	-	-	-	-	-	-
12'	4,04	63,99	4,05	64,27	4,04	64,02	4,05	64,31
13'	1,72	26,86	1,73	26,86	1,72	26,90	1,73	26,84
14'	2,03	35,77	2,03	35,78	2,03	35,79	2,03	35,77
15'	-	133,67	-	133,61	-	133,67	-	133,59
16'	5,13	125,03	5,14	125,13	5,13	125,06	5,14	125,14
17'	2,08	26,63	2,08	26,66	2,08	26,65	2,08	26,66
18'	1,98	39,65	1,99	39,67	1,99	39,66	1,98	39,66
19'	-	135,11	-	135,13	-	135,11	-	135,12
20'	5,14	124,35	5,15	124,38	5,15	124,37	5,15	124,37
21'	2,01	28,24	2,02	28,26*	2,02	28,25*	2,02	28,25*
22'	2,01	28,24	2,02	28,27*	2,02	28,26*	2,02	28,26*
23'	5,14	124,25	5,155	124,27	5,16	124,27	5,15	124,25
24'	-	134,96	-	134,97	-	134,96	-	134,96
25'	1,98	39,73	1,99	39,75	1,99	39,74	1,98	39,74
26'	2,08	26,63	2,08	26,66	2,08	26,65	2,08	26,66
27'	5,12	124,23	5,13	124,25	5,12	124,25	5,12	124,24
28'	-	134,89	-	134,91	-	134,90	-	134,91
29'	1,98	39,71	1,98	39,72	1,99	39,72	1,98	39,72
30'	2,06	26,74	2,07	26,76	2,07	26,76	2,07	26,75
31'	5,10	124,37	5,11	124,40	5,10	124,39	5,10	124,38
32'	-	131,25	-	131,26	-	131,24	-	131,25
33'	1,68	25,69	1,69	25,70	1,69	25,68	1,69	25,70
34'	1,60	17,67	1,61	17,68	1,60	17,67	1,61	17,68
35'	1,60	15,99	1,61	16,00	1,60	15,99	1,61	16,00
36'	1,60	16,03	1,61	16,05	1,60	16,04	1,61	16,05
37'	1,60	16,02	1,61	16,04	1,60	16,03	1,61	16,04
38'	1,60	15,86	1,61	15,87	1,60	15,86	1,61	15,87

* felcserélhető jelhozzárendelés

4.1.2. Térszerkezet, izoméria vizsgálata

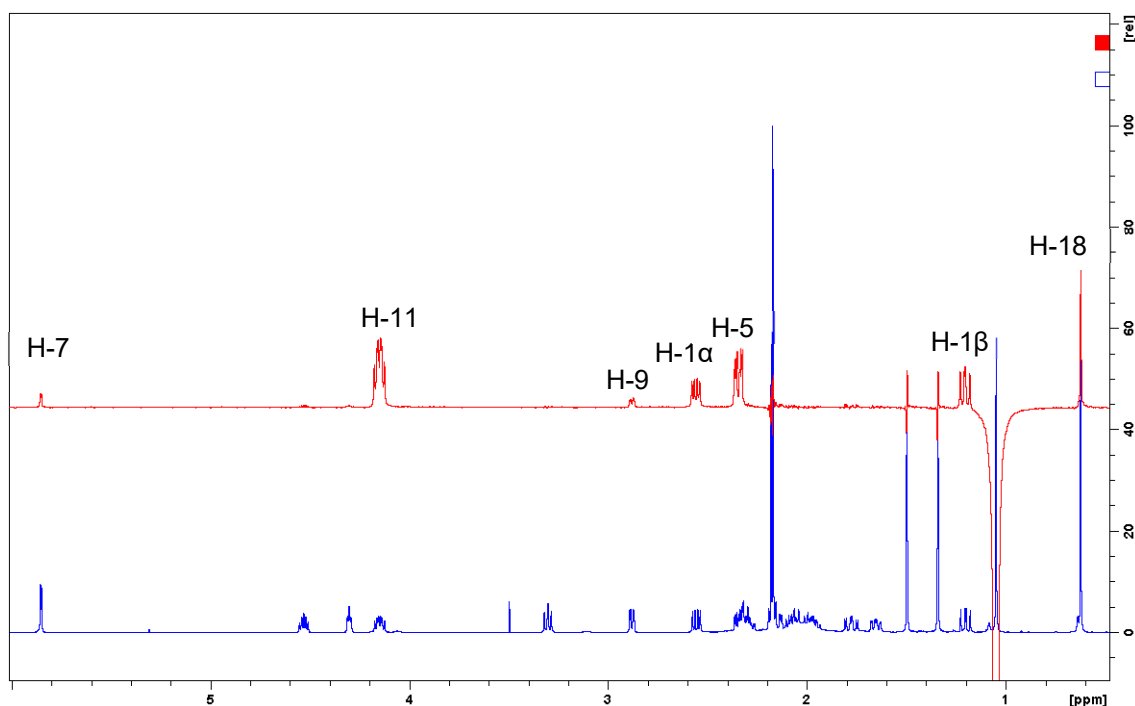
4.1.2.1. A szteránváz A/B gyűrűkapcsolódásának megállapítása

Feladatunk volt annak megállapítása, hogy a vizsgált vegyületekben *transz* vagy *cisz* az A/B gyűrűkapcsolat, a H-5 hidrogén α vagy β térállású. Megkülönböztetésük NMR spektroszkópiával a téren keresztüli kölcsönhatások felhasználásával lehetséges, esetünkben ROESY kísérletekkel. Egy lehetséges NOE interakció a H₃-19 és a H-5 hidrogénatomok között eldöntheti A/B gyűrűkapcsolat konfigurációját. Az 5 α -androsztán alapváz esetén az A/B gyűrűkapcsolódás *transz*, a CH₃-19 β -térállásban a szteránváz síkja felett, míg a H-5 hidrogénatom α -pozícióban a szteránváz síkja alatt helyezkedik el. Köztük ebben az esetben nincs várható NOE kölcsönhatás, távolságuk meghaladja az 5 Å-t, a CH₃-19-ről pl. a H-4 β ad NOE-korrelációt. Ha 5 β -androsztán szerkezetéhez hasonló alapvázal jellemezhetőek a vizsgált vegyületeink, ebben az esetben a β -térállású CH₃-19 hidrogénatomjai és a szintén β -helyzetű H-5 között téren keresztüli kölcsönhatást kell mérnünk, távolságuk 4 Å-n belüli, a szteránváz síkjának azonos oldalán találhatók. (29. ábra)



29. Ábra: Az A/B gyűrűk kapcsolata és a lehetséges NOE korreláció jelölése; a karbonilcsoport és a kettőskötés jelenléte miatt torzult B gyűrű közelítőleges szerkezetével

Egydimenziós szelektív ROESY kísérleteket végeztünk a vegyületek konfigurációjának megállapításához. A CH₃-19 metilcsoport ¹H jele szelektíven besugározható volt, a spektrumban NOE jelet kaptunk H-5 jele esetén, amely bizonyítékul szolgált 5 β relatív konfiguráció megállapításához. (30. ábra)



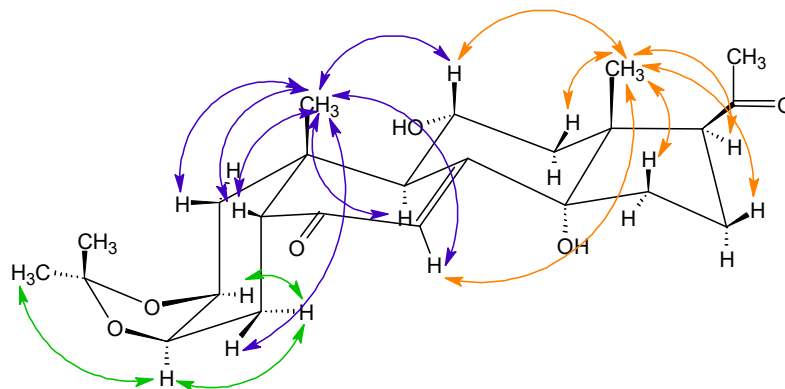
30. Ábra: **2a** 1D szelektív ROESY spektruma (piros, besugározva: H₃-19) összehasonlításban ¹H NMR spektrummal (kék); 500 MHz

4.1.2.2 A szteránváz diasztereotóp csoportjainak vizsgálata

A teljes jelhozzárendelés elkészítése során leírtuk a szteránváz és szubsztituensei egyes protonjainak kémiai eltolódás értékeit. A metilén hidrogének esetén diaszterotópia áll fenn, ezek kémiai eltolódása eltérő frekvencián jelentkezett. A megfelelő α vagy β pozíció megállapításához szintén a ROESY kísérleteket alkalmaztuk. Az alapváz szerint a CH₃-18 és CH₃-19 β -térállású szubsztituensek, így ezek szelektív gerjesztésével feltérképezhetők a molekula azonos oldalán található ¹H jelek. H₃-18 gerjesztésével H-12 β , H-15 β , H-16 β meghatározható volt, H-11 esetén is kölcsönhatást detektáltunk, így az itt található hidroxilcsoport α térállásúként írható le. A 11-es pozícióban metilénecsoportot tartalmazó származékok esetében is meghatározható volt a diasztereotóp hidrogének térállása. H₃-19 gerjesztésével az előbbieken leírt H-5 hidrogénatommal való interakción felül a H-1 β , és H-11 / H-11 β hidrogénekkel való kölcsönhatással támasztjuk alá a kérdéses hidrogének térállását.

Külön kísérletben vizsgáltuk CH-2 és CH-3 atomcsoportokat, ahol az acetonid szerkezeti elem kapcsolódik. Mindkét ¹H jel egyszerre történő gerjesztésével H-1 α , H-4 α és H-9 (α) szenvedett intenzitásváltozást, ezáltal ezek a hidrogének is a szteránváz síkja

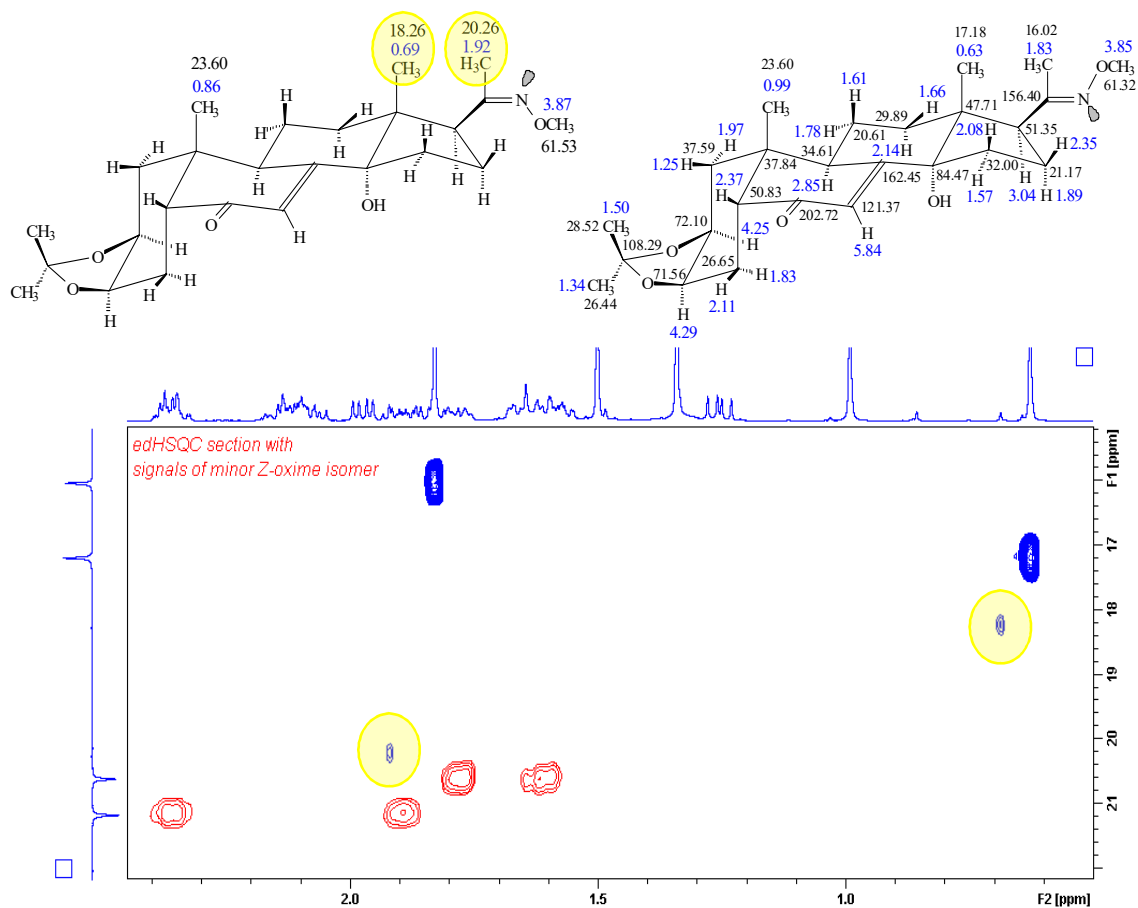
alatti pozícióval kerültek megállapításra. A C-22 kvaterner szénatomhoz kapcsolódó metilcsoportok közül a kisebb kémiai eltolódású csoporttal való interakció bizonyította ezen csoport α pozícióját, míg a másik kapcsolódó metilcsoportot β térállással írtuk le. (31. ábra)



31. Ábra: **2a** fontosabb ROESY térközelségei H₃-18 (narancssárga) H₃-19 (kék) és H-2 + H-3 (zöld) gerjesztésével.

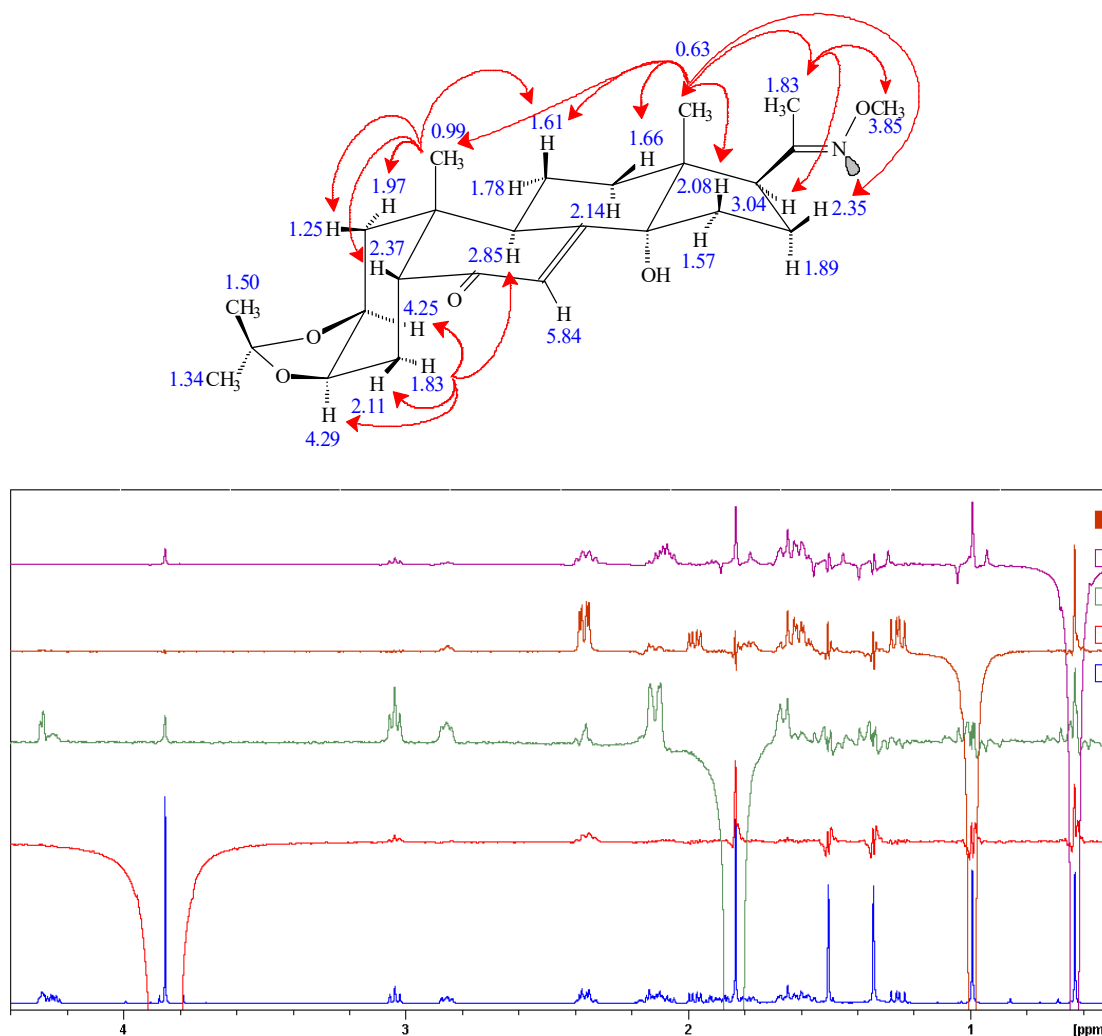
4.1.2.3. Az oximcsoport konfigurációjának megállapítása

Az **1a-c** vegyületek oximcsoportot tartalmaznak, mely esetében a C=N kettőskötés mentén *E/Z* izoméria lehetséges. A molekula geometriáját eldönthette volna egy téren keresztüli NOE kölcsönhatás jelenlétének detektálása az oxim OH és H₃-21 között, de az oxim OH jel deuterált DMSO-ban való vizsgálat során is egy kiszélesedett szingulettként jelentkezett, így a megfelelő NOE-térközelségek kimérésére nem volt alkalmas. Az irodalom alapján az oxim OH-hoz képest γ -pozícióban elhelyezkedő ¹³C atom kémiai eltolódása az *E*- és *Z*-izomerek esetén számottevően eltér [138], ám az egyetlen jelenlevő jelsorozat esetében nem volt lehetőségünk a C-21 ¹³C atom kémiai eltolódásának összehasonlítására a két izomerben. Ezen nehézségek figyelembevételével a probléma megoldására a vegyület 20-oxim-metiléter származékának vizsgálata történt meg. Ebben az esetben már két jelsorozatot detektáltunk a vegyület NMR spektrumaiban. A kb. 95%-ban jelen levő fő komponensre a teljes ¹H és ¹³C jelhozzárendelés elkészítése lehetséges volt, a minor komponens esetében is sikeresen azonosítottuk a megkülönböztetéshez szükséges jeleket (OCH₃; CH₃-21; CH₃-18; CH₃-19). (32. ábra)



32. Ábra: **1a** és oxim-éter származékának (**1d**) editált HSQC részlete; 500 MHz

A fő jelsorozat OCH₃ ¹H jelének szelektív gerjesztése esetén 1D-ROESY spektrumban egyértelmű kölcsönhatást tapasztaltunk a H₃-21 jellel, ez a kísérlet az *E* izomer jelenlétét erősítette meg, mint fő jelsorozat. (33. ábra)

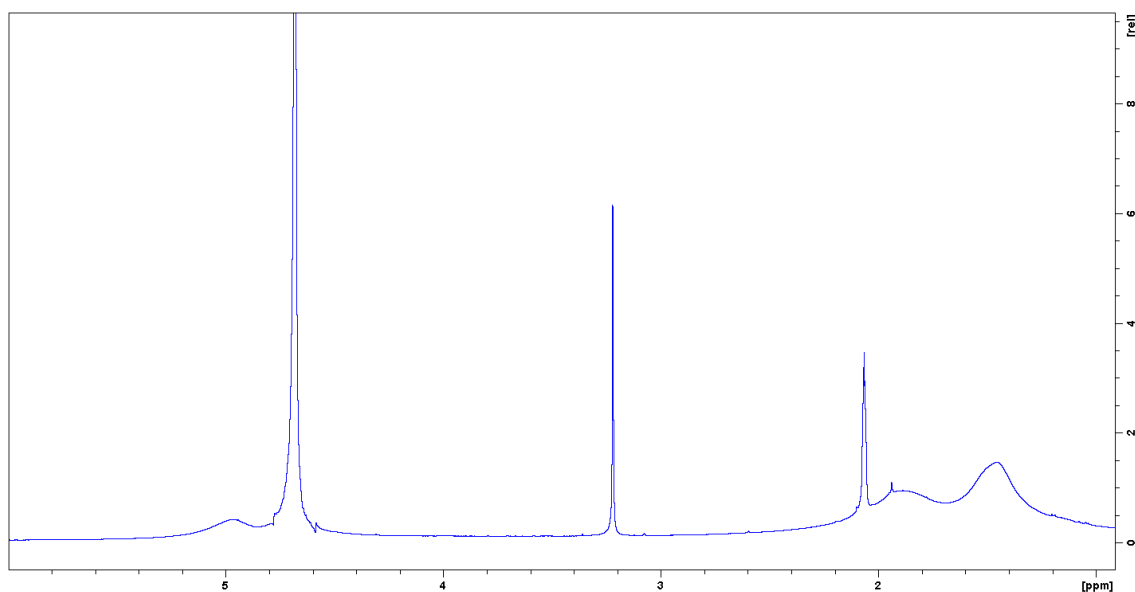


33.Ábra: **1d** 1D szelektív ROESY spektrumai és ROESY térközelségei. Szelektív gerjesztések: OCH₃ (piros); H₃-21 + H-4a (zöld); H₃-19 (barna); H₃-18 (lila); 500 MHz

Most már a δ C-21 kémiai eltolódás értékek is összehasonlíthatóvá váltak. A mért $\Delta\delta = 4,2$ ppm kémiai eltolódáskülönbség összhangban van az irodalomban leírtakkal. [41-43] Az előbbieken detektált δ C-21 kémiai eltolódásokat figyelembe véve állapítottuk meg **1b** és **1c** oldallánccal rendelkező ekdiszteroid oximok konfigurációját. Ennek alapján mindkét vegyületet 20(*E*)-oximszármazékként azonosítottuk.

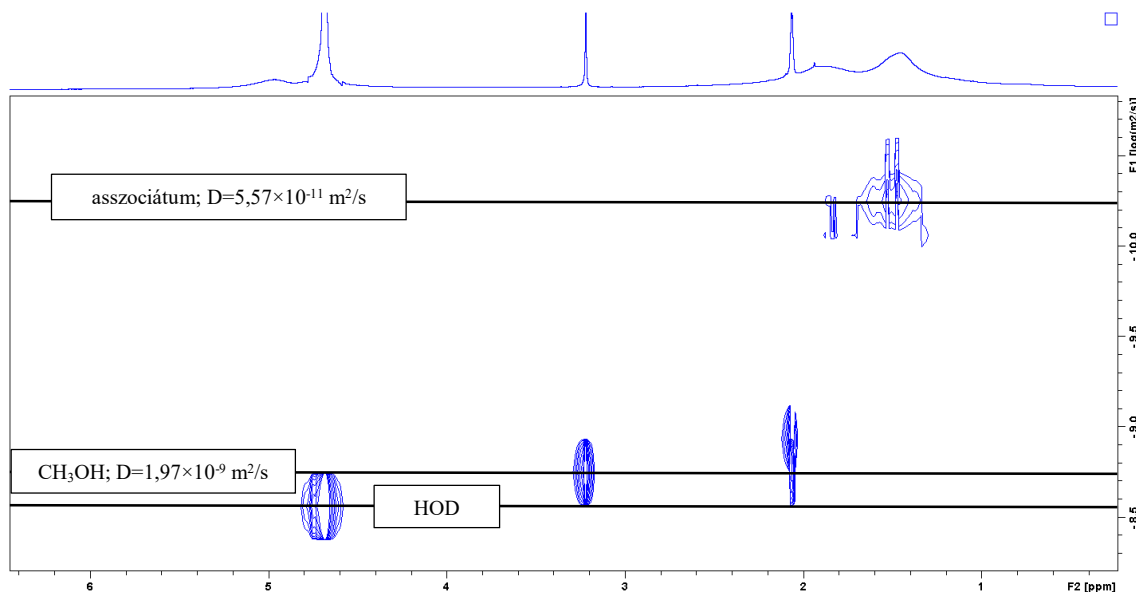
4.1.3. Az önrendeződés vizsgálata

A **2b** ekdiszteroid-szkvalén konjugátum mintáját D₂O-ban vizsgáltuk, a nanoasszociátumok képződésének kedvező módszerrel készült a vizsgálati minta (leírása a Módszerek fejezetben). Az ¹H spektrumban három széles jelcsoport jelentkezett, a jelek finomszerkezete nem volt megfigyelhető. (34. ábra) A minta a szokásos folyadékfázisú NMR módszerekkel nem volt vizsgálható. A minta erős opálos megjelenése is azt a feltételezést erősítette meg, hogy asszociátumok képződtek. Esetükben már nem molekulaszerkezeti, hanem anyagszerkezeti problémát kellett megoldani.



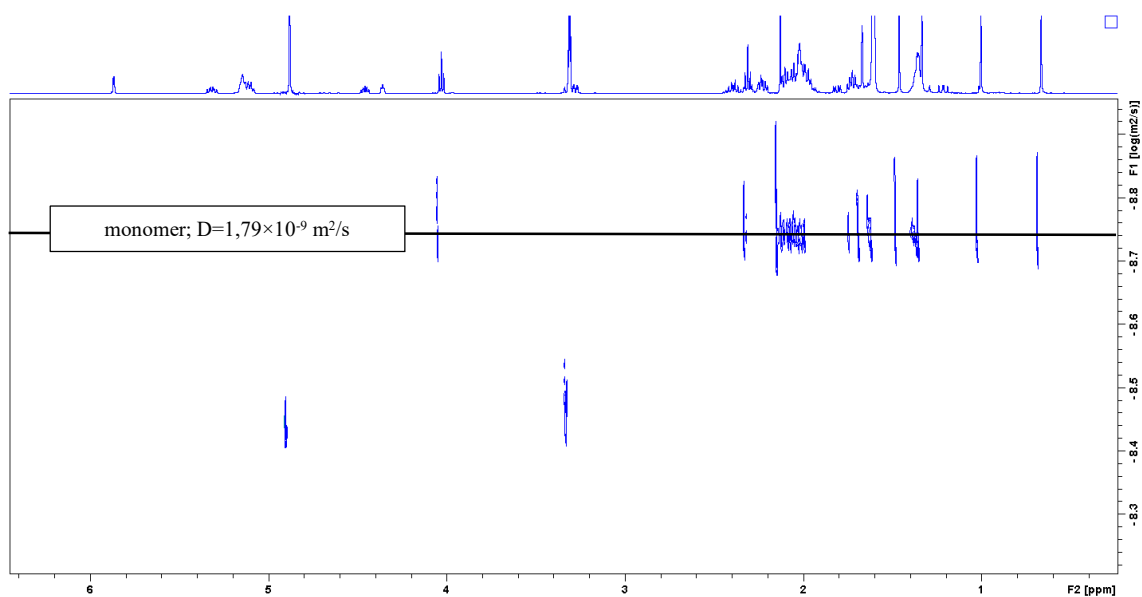
34. Ábra: **2b** vizes mintájának ¹H NMR spektruma; 500 MHz

A DOSY NMR módszert alkalmaztuk esetünkben a nanoasszociátum vizsgálatára. (35. ábra) A mintában belső referenciaként metanolhoz hasonlítottuk a DOSY pszeudo 2D spektrumról leolvasott diffúziós koefficiens értéket. Ebből számítva az asszociátum molekulatömege $1,04 \pm 0,2 \times 10^6$ g/mol-nak adódott, amely a monomer molekulatömegének kb. 1057-szerese, így egy kb. 1000 tagból álló asszociátum feltételezhető.



35. Ábra: **2b** által létrehozott asszociátum DOSY spektruma vizes közegben az y tengelyen a diffúziós állandó található ($\log(\text{m}^2/\text{s})$); 500 MHz

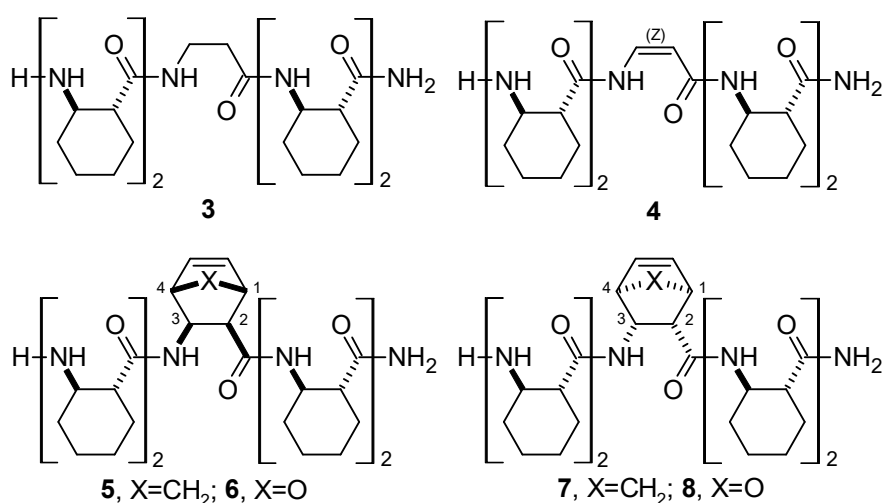
A **2b** vegyületből CD_3OD -ban való oldás után is felvettük az ^1H és DOSY spektrumot. (36. ábra) A ^1H NMR spektrumban egyetlen, jól vizsgálható finomszerkezettel és diszperzióval jellemezhető jelsorozatot detektáltunk, amely a várt monomerként való jelenlétnek felel meg ezen körülmények között. A pszeudo 2D spektrumból leolvasható diffúziós koefficiens számottevően eltér az asszociátum diffúziós koefficiensétől. Itt az Einstein-Stokes egyenletből számítottuk a monomer hidrodinamikai sugarát, amely 0,34 nm számításaink alapján. Ugyanígy az asszociátumra vonatkozó hidrodinamikai sugár a vizes mintában 4,64 nm az egyenlet alapján. Modellünkben szférikus részecskékként kezelve ezeket, monomerként a térfogata 0,16 nm^3 , az asszociátum 419,45 nm^3 . Az asszociátum térfogata kb. 2635-szorosa a monomeréhez hasonlítva.



36. Ábra: **2b** DOSY NMR spektruma CD₃OD-ban; 500 MHz

4.2. β -Peptidek szerkezetvizsgálata

Hat különböző β -peptidet vizsgáltunk, amelyek *transz*-ACHC aminosavegységekből épültek fel, harmadik aminosavként más-más építőelemet tartalmazva. (37. ábra) Ezek hatását vizsgáltuk a *transz*-ACHC peptidláncokra jellemző H14 hélix stabilitására vonatkozóan. A β -alanint, mint nagy konformációs szabadságú, flexibilis aminosavat tanulmányoztuk, ezzel szemben a *Z* konfigurációjú dehidro- β -alanint, mint rigid egységet alkalmaztuk. A biciklusos aminosavegységek esetén mind az oxigénatom beépülésére, mind ezek eltérő konfigurációjának hatására kíváncsiak voltunk.

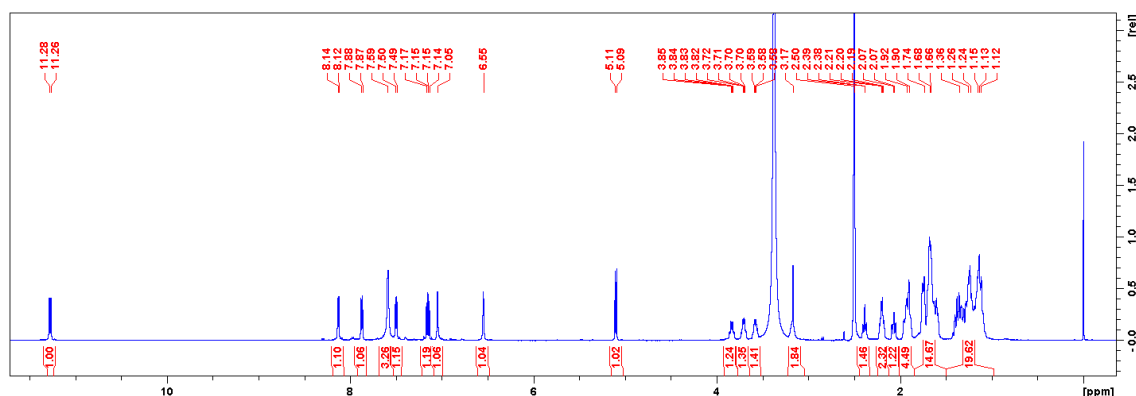


37. Ábra: A vizsgált β -peptidek

4.2.1 A gerincprotonok hozzárendelése

A vegyületek ^1H NMR spektrumában a 6 ppm feletti régióban helyezkednek el az amidkötések NH hidrogénatomjai dublett jelként. A vizsgált vegyületek C-terminális karboxilcsoportja helyén amidcsoport található, az itt elhelyezkedő NH_2 jelek egy-egy szingulettként detektálhatók. Az N-terminális hidrogénjei mint egy kiszélesedett szingulett jelentkeznek a spektrumban, szintén 6 ppm kémiai eltolódás érték felett. A 4-es pentamer harmadik aminosav egysége dehidro- β -alanin, amely két sp^2 CH csoportot tartalmaz, ezek a következő tartományokban találhatók oldószerfüggő módon: C_αH : 5,1 – 5,2 ppm; C_βH : 7,1 – 7,3 ppm. Az ABHEC és AOBHEC építőegységekben is található kettős kötés, amelyben az sp^2 csoportok hidrogénatomjai 6,1 – 6,6 ppm közötti kémiai eltolódás értékkel írhatók le. Az AOBHEC egységben oxigénatom szerepel a biciklusban,

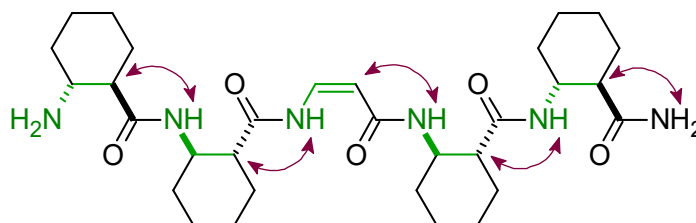
a hozzá kapcsolódó metilénsoportok 4,7 – 5,3 ppm régióban detektálhatók. Az ABHEC egységben az oxigénatomot metilénsoport helyettesíti, mely kémiai eltolódásait 1,5 és 2,3 ppm között írtuk le az egyes származékokban. A biciklusok további CH csoportjai 2,5 – 3,1 ppm között rezonálnak. A $C_{\beta}H$ hidrogének kémiai eltolódása az ACHC egységek esetén 3,1 – 4,1 ppm között, β -alanin esetén 2,7 – 4,0 ppm között, az ABHEC/AOBHEC biciklusokban 3,7 – 4,3 ppm között észlelhető. A $C_{\alpha}H$ hidrogének az ACHC építőelemekben 2,0 – 3,0 között, a β -alanin esetén 2,2 – 2,4 ppm között, ABHEC/AOBHEC biciklusokban 2,2 – 2,8 ppm között detektálhatók. A 2 ppm alatti spektrumrészletben számos átfedéssel találkozunk, az ACHC ciklohexán gyűrűjének fent nem említett csoportjaitól származva. (38. ábra)



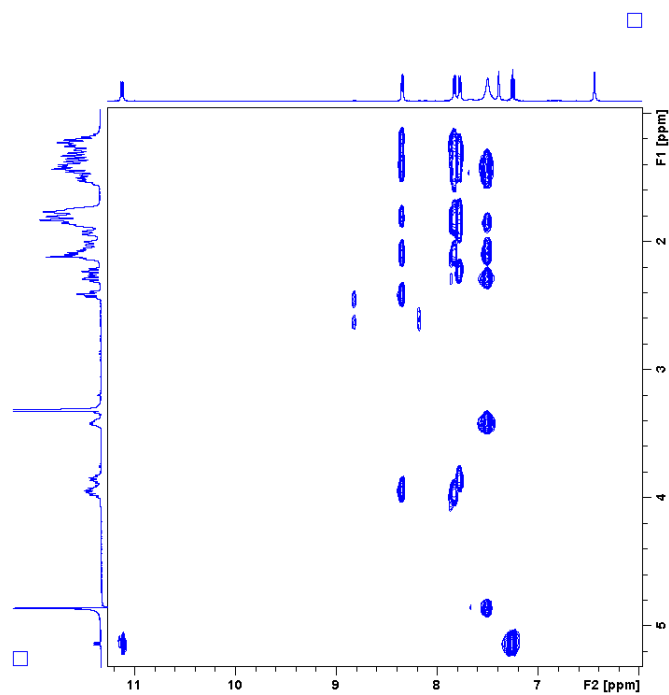
38. Ábra: 4-es vegyület 1H NMR spektruma; DMSO- d_6 ; 4 mM; 298K; 600 MHz

A vegyületek gerincprotonjainak hozzárendelését a **4** vegyületen mutatom be részletesen. (39. ábra) Jó kiindulópont a láncvégi amid NH_2 azonosítása, mely két szingulett jelként jelentkezett (7,05 és 6,55 ppm). Innen a ROESY spektrumban található keresztcsúccsal azonosítható $C_{\alpha}H^5$ (2,20 ppm). Ezután TOCSY/COSY spektrumból a szomszédos $C_{\beta}H^5$ (3,58 ppm) és az NH^5 hidrogénhez található keresztcsúcs a $C_{\alpha}H^5$ hidrogénatomtól kiindulva. Egy ROESY korreláció NH^5 -től $C_{\alpha}H^4$ -hez (2,07 ppm) vezet, majd innen újból TOCSY/COSY korrelációkkal térképeztük fel a spinrendszer $C_{\beta}H^4$ (3,84 ppm) és NH^4 (7,87 ppm) jeleit. A 3. aminosavegység a hat vizsgált vegyületben különbözött. Ezekben az építőelemekben is a fentiekkel azonosan fejtettük meg a $C_{\alpha}H^3$ – $C_{\beta}H^3$ – NH^3 rendszert (5,10 ppm – 7,15 ppm – 11,27 ppm). A dehidro- β -alanin kettőskötésének a konfigurációja is megállapításra került, a $C_{\alpha}H^3$ – $C_{\beta}H^3$ közötti NOE-

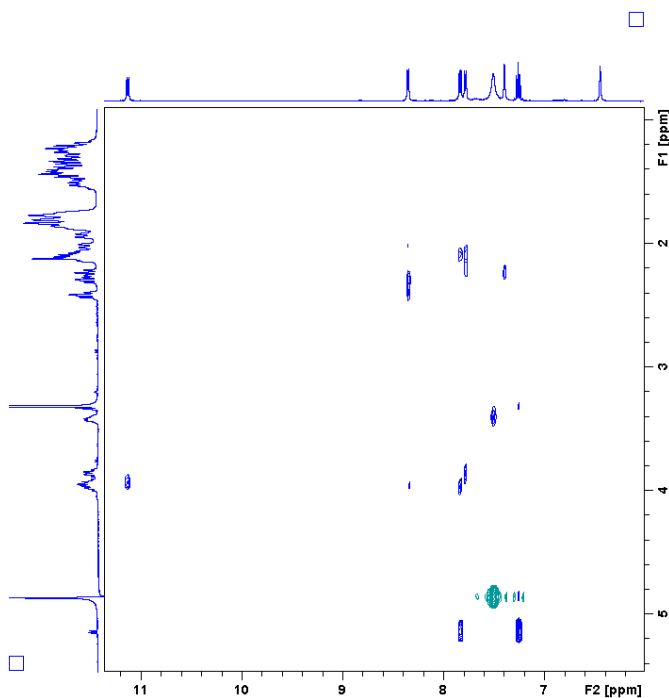
interakció által *Z* izomerként írtuk le. Ezt alátámasztotta a $C_\alpha H^3 - C_\beta H^3$ közötti csatolási állandó is, melynek értéke 9,0 Hz volt. Az ABHEC és AOBHEC aminosavak további csoportjait is feltérképeztük a TOCSY, COSY és ROESY spektrumok segítségével. $C_1 H^3$ és $C_4 H^3$ megkülönböztetése a NH^2 és NH^3 –hoz való NOE-térközelség alapján történt meg. A két magasabb kémiai eltolódás értéknél elhelyezkedő sp^2 CH csoportok megkülönböztetése ezután a $C_1 H^3$ vagy $C_4 H^3$ -hoz való NOE interakcióval volt megkülönböztethető. Az ABHEC elem esetén az áthidaló CH_2 a TOCSY-ban megfejtett spinrendszer utolsó keresztcsúcsaihoz tartozik. A második és első aminosav hidrogének hozzárendelése szintén az előzőekben ismertetett stratégiával zajlott: ROESY spektrumban NH^3 és $C_\alpha H^2$ (2,39 ppm) közti korreláció azonosításával, majd TOCSY/COSY spektrum segítségével $C_\alpha H^2 - C_\beta H^2$ (3,71 ppm) szomszédos atomcsoportok azonosításával a második AHC elemet fejtettük meg; ugyanígy NH^2 és $C_\alpha H^1$ (2,21 ppm) közti NOE interakcióval az első elem α hidrogénatomjai kerültek leírásra és innen a spinrendszer leírása $C_\beta H^1$ -ig (3,17 ppm). Az N-terminális NH_2 csoport (3,17 ppm) az esetek többségében kiszélesedett szingulettként jelentkezett. (Jelhozzárendeléshez használt fontosabb spektrumrészletek a 40. és 41. Ábrán láthatók) A vegyületek jelhozzárendelését a 3., 4. és 5. Táblázat tartalmazza.



39. Ábra: A gerincprotonok hozzárendelésének menete ROESY térközelségek (lila nyilak) és TOCSY kölcsönhatások (zöld spinrendszerek) segítségével, bemutatva a 4-es vegyületen



40. Ábra: A 4-es vegyület TOCSY spektrumának amid NH/ $C_{\alpha}H$, $C_{\beta}H$ tartománya;
DMSO- d_6 ; 4 mM; 298K; 600 MHz



41. Ábra: A 4-es vegyület ROESY spektrumának amid NH/ $C_{\alpha}H$, $C_{\beta}H$ tartománya;
DMSO- d_6 ; 4 mM; 298K; 600 MHz

3. Táblázat A vizsgált β -peptidek jelhozzárendelése; kémiai eltolódás értékek ppm-ben
 kémiai eltolódások H_2O/D_2O -ben:

	3	4	5	6	7	8
NH_2^1	7,51	7,46		7,50	7,60	7,57
$C_\beta H^1$	3,27	3,29	3,26	3,33	3,26	3,31
$C_\alpha H^1$	2,45	2,23	2,66	2,65	2,18	2,28
NH^2	7,97	8,12	7,85	7,84	7,99	7,99
$C_\beta H^2$	3,76	3,79	3,72	3,77	3,72	3,75
$C_\alpha H^2$	2,36	2,45	2,58	2,62	2,20	2,22
NH^3	7,81	10,96	7,18	7,57	7,89	7,88
$C_\beta H^3$	3,52 3,04	7,12	3,99	4,26	3,80	4,15
$C_\alpha H^3$	2,30	5,14	2,41	2,72	2,28	2,62
NH^4	7,85	7,82	7,35	7,28	7,72	7,50
$C_\beta H^4$	3,77	3,84	4,00	3,97	3,64	3,78
$C_\alpha H^4$	2,09	2,10	2,20	2,29	2,14	2,21
NH^5	7,93	7,76	7,96	7,99	7,67	7,72
$C_\beta H^5$	3,76	3,71	3,87	3,89	3,57	3,66
$C_\alpha H^5$	2,26	2,23	2,27	2,27	2,26	2,28
$CONH_2$	7,44 6,80	7,33 6,49	7,47 6,42	7,39 6,58	7,23 6,57	7,29 6,64
$C_1 H^3$			2,90	5,20	2,76	4,97
$C_4 H^3$			2,69	4,95	2,51	4,74
$C_5 H^3$			6,18	6,45	6,19	6,45
$C_6 H^3$			6,11	6,47	6,11	6,48
CH_2^3			1,64 1,55		1,83 1,45	

4. Táblázat: A vizsgált β -peptidek jelhozzárendelése; kémiai eltolódás értékek ppm-ben
 kémiai eltolódások CD_3OH -ban:

	3	4	5	6	7	8
NH ₂ ¹	7,77	7,50	8,53	7,71		7,67
C _β H ¹	3,32	3,41	3,94	3,31	3,33	3,27
C _α H ¹	2,95	2,28	2,93	2,79	2,46	2,68
NH ²	8,37	8,35	8,39	8,23	8,18	7,99
C _β H ²	4,02	3,93	3,94	3,93	3,87	3,83
C _α H ²	2,74	2,41	2,94	2,90	2,36	2,63
NH ³	8,17	11,12	7,63	7,97	8,12	7,18
C _β H ³	3,98 2,87	7,26	4,19	4,29	3,77	3,88
C _α H ³	2,43 2,36	5,13	2,44	2,67	2,38	2,57
NH ⁴	7,90	7,83	7,45	7,16	7,94	8,11
C _β H ⁴	4,08	3,96	4,26	4,15	3,94	4,06
C _α H ⁴	2,19	2,09	2,32	2,32	2,17	2,21
NH ⁵	7,93	7,78	7,81	7,84	7,73	7,83
C _β H ⁵	403	3,85	4,15	4,09	3,87	3,89
C _α H ⁵	2,33	2,23	2,30	2,25	2,26	2,28
CONH ₂	7,55 6,86	7,39 6,44	7,47 6,49	7,29 6,54	7,39 6,71	7,34 6,62
C ₁ H ³			3,00	5,20	2,78	4,92
C ₄ H ³			2,81	5,04	2,89	5,24
C ₅ H ³			6,24	6,49	6,18	6,43
C ₆ H ³			6,19	6,45	6,23	6,45
CH ₂ ³			1,81		2,22 1,49	

5. Táblázat: A vizsgált β -peptidek jelhozzárendelése; kémiai eltolódás értékek ppm-ben
 kémiai eltolódások DMSO- d_6 -ban:

	3	4	5	6	7	8
NH ₂ ¹		7,59		7,55	7,66	7,63
C _{β} H ¹	3,15	3,17		3,13	3,12	3,12
C _{α} H ¹	2,66	2,21	2,64	2,63	2,18	2,35
NH ²	8,03	8,13	7,91	7,79	7,92	7,86
C _{β} H ²	3,85	3,71	3,79	3,78	3,63	3,63
C _{α} H ²	2,60	2,39	2,80	2,76	2,20	2,32
NH ³	7,77	11,27	7,36	7,51	7,87	7,37
C _{β} H ³	3,80 2,76	7,15	3,99	4,12	3,71	3,83
C _{α} H ³	2,30 2,29	5,10	2,26	2,50	2,29	2,47
NH ⁴	8,05	7,87	7,68	7,31	7,86	7,94
C _{β} H ⁴	3,90	3,84	4,08	4,02	3,68	3,79
C _{α} H ⁴	2,18	2,07	2,33	2,31	2,20	2,21
NH ⁵	7,92	7,50	7,79	7,97	7,41	7,59
C _{β} H ⁵	3,85	3,58	3,98	3,94	3,58	3,67
C _{α} H ⁵	2,26	2,20	2,24	2,24	2,21	2,19
CONH ₂	7,45 7,04	7,05 6,55	7,49 6,59	7,33 6,62	6,96 6,50	6,99 6,54
C ₁ H ³			2,99	5,23	2,70	4,85
C ₄ H ³			2,63	4,91	2,56	4,81
C ₅ H ³			6,16	6,50	6,16	6,48
C ₆ H ³			6,22	6,43	6,23	6,45
CH ₂ ³			1,68 1,63		2,07 1,31	

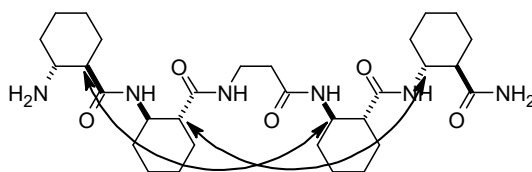
4.2.2. Az önrendeződés vizsgálata

A rendezett konformáció stabilitásának vizsgálatához többféle analitikai módszert alkalmaztunk. A kétdimenziós ROESY kísérletek által olyan NOE-térközelségeket kerestünk, amelyek nem a konstitúcióból következnek, hanem konformációból. Az NH-ND csere megfigyelése során az egyes amid NH-k oldószer általi hozzáférhetőségét térképeztük fel, amely információ alapján a H-hidak által kialakított másodlagos szerkezetek stabilitására következettünk. Az ECD mérések során a detektált sávok jellemzőek az egyes hélix típusokra, ez is alátámasztotta a rendezett struktúra jelenlétét és típusát.

4.2.2.1. Rendezettség igazolása NOE-térközelségek által

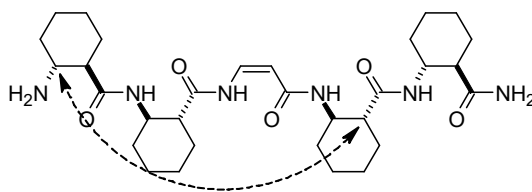
Három különböző oldószerben történt meg a kétdimenziós ROESY spektrumok felvétele: H₂O/D₂O (90% / 10% v/v), CD₃OH és DMSO-*d*₆. Célunk az egyes távolható NOE-kölcsönhatások feltérképezése volt, amelyek segítségével következtethetünk a másodlagos szerkezetet stabilizáló H-hidak helyzetére. A NOE-kölcsönhatások hiánya a rendezetlenség bizonyítéka.

A β-alanint tartalmazó származék esetén több, rendezettséget igazoló NOE-kölcsönhatást azonosítottunk. A C_αH¹ – C_βH⁴, illetve a C_αH² – C_βH⁵ hidrogének közti interakció mind a H14 hélix jelenlétét támasztotta alá. Ezeket a korrelációkat mindhárom oldószerben felvett spektrumban azonosíthattuk. Emellett vízben C_βH² – C_βH⁵ közti keresztcsúcs is megjelent. (42. ábra)



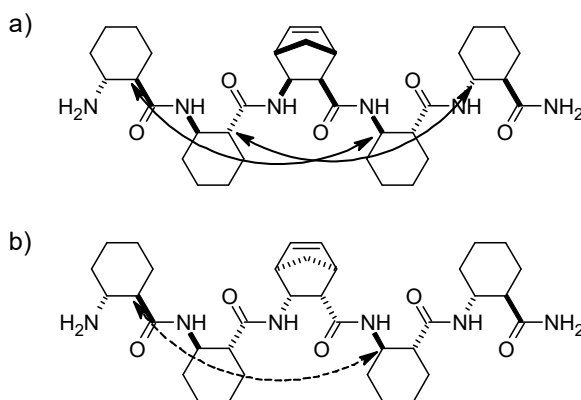
42. Ábra: NOE térközelségek 3-as vegyület esetén; 4 mM; 298K

Azonban amikor a Z-dehidro-β-alanin helyettesítette a harmadik aminosavat, a stabil rendezettségre utaló ROESY korrelációk nem voltak detektálhatók. Egyetlen gyenge keresztcsúcs jelentkezett C_βH¹ – C_αH⁴ között. (43. ábra)



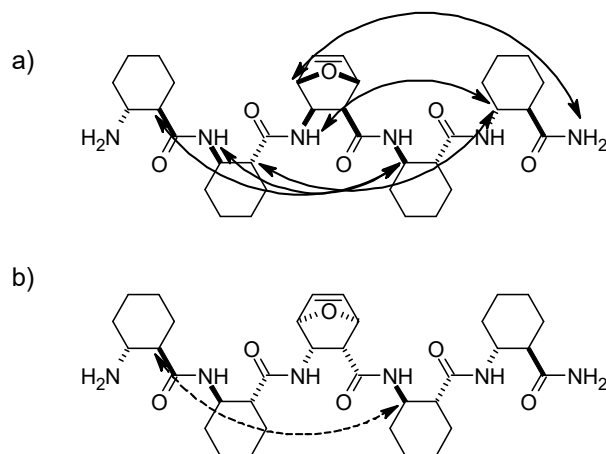
43. Ábra: NOE térközelségek 4-es vegyület esetén; 4 mM; 298K

[1*R*,2*R*,3*S*,4*S*]-*diexo*-ABHEC (5) és [1*S*,2*S*,3*R*,4*R*]-*diexo*-ABHEC (7) mint harmadik aminosav eltérő módon befolyásolta a rendezett konformer kialakulását. Az 5-ös vegyületben a H14 hélixre jellemző $C_\alpha H^2 - C_\beta H^5$ keresztcsúcs volt látható, emellett a $C_\alpha H^1 - C_\beta H^4$ korreláció is megjelent CD₃OH-ban. A rendezetlen szerkezetre engedett következtetni a 7-es vegyület esetében egyetlen gyenge H14 karakterisztikus korreláció: $C_\alpha H^1 - C_\beta H^4$. (44. ábra)



44. Ábra: NOE térközelségek 5-ös (a) és 7-es (b) vegyületek esetén; 4 mM; 298K

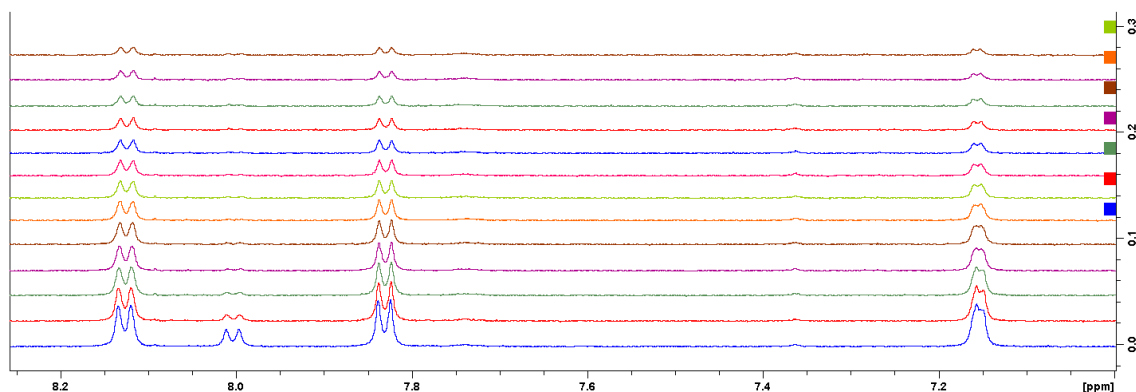
[1*R*,2*S*,3*R*,4*S*]-*diexo*-AOBHEC-t és enantiomer párját, [1*S*,2*R*,3*S*,4*R*]-*diexo*-AOBHEC-t tartalmazta 6 és 8. A legtöbb szerkezetet alátámasztó kölcsönhatást 6-os vegyület esetén észlelhettük. Mindhárom oldószerben megjelent a $C_\alpha H^i - C_\beta H^{i+3}$ ($i=1,2$) NOE-térközelség, mint a H14 hélix egyértelmű bizonyítéka. Szintén mindhárom oldószer esetén detektálható volt a $NH^2 - C_\beta H^4$ korreláció a ROESY spektrumban. CD₃OH-ban további két keresztcsúcs volt azonosítható: $C_2 H^3 - COONH_2^5$ és $NH^3 - C_\beta H^5$. DMSO-ban még egy gyenge korreláció adódott NH^1 és $C_\alpha H^3$ között. A másik enantiomer építőelem beépülésével a stabil rendezett struktúra nem igazolható, itt csak a $C_\alpha H^1 - C_\beta H^4$ térközelség volt látható gyenge módon CD₃OH-ban és DMSO-*d*₆-ban. (45. ábra)



45. Ábra: NOE-térközelségek **6** és **8** vegyületekben; 4 mM; 298K

4.2.2.2. NH amid hidrogénatomok deutériumcseréjének követése

Az amid NH hidrogénatom cseréjét deutériumra CD₃OD-ben vizsgáltuk. Az adott csoport NH-ND cserefolyamata annál lassabb, minél védettebb az oldószerrel szemben az adott csoport, tehát minél stabilabbak a másodlagos szerkezetet kialakító H-kötések. Minden esetben az N-terminális NH₂ és a COONH₂ csoport protonjai azonnal lecseréltek deutériumra beoldás után. (46. ábra)

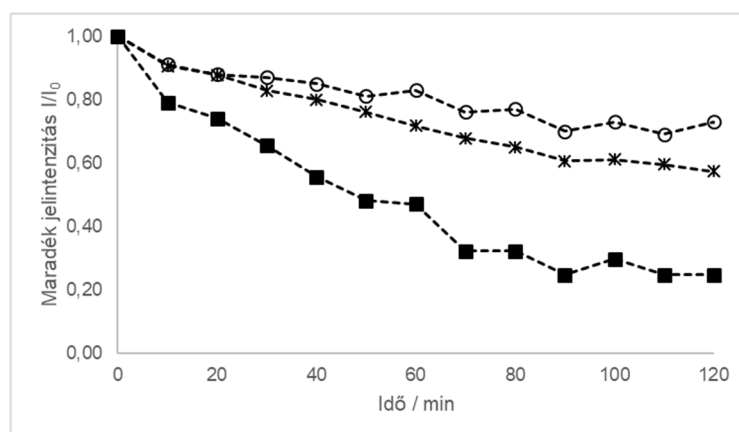


46. Ábra: A **8**-as vegyület ¹H spektrumai CD₃OD-ban, az amid NH-k tartománya;
4 mM; 298K; 400 MHz

Felvétel időpontjai lentől felfelé: közvetlenül beoldás után, 10 perc, 20 perc, 30 perc, 40 perc, 50 perc, 60 perc, 70 perc, 80 perc, 90 perc, 100 perc, 110 perc, 120 perc

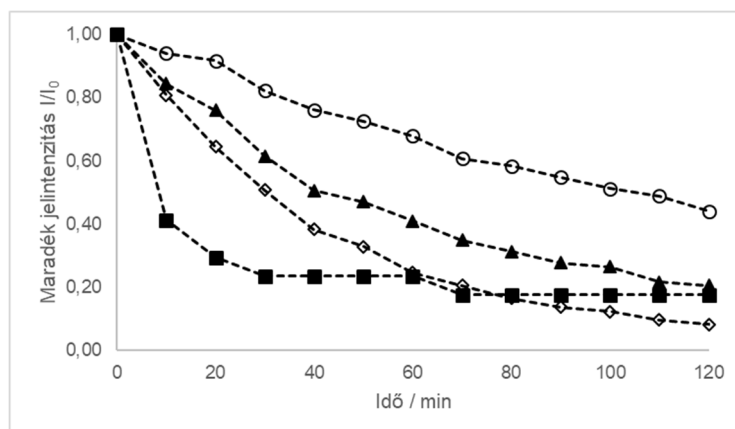
8,11 ppm: NH⁴; 7,98 ppm: NH²; 7,81 ppm: NH⁵; 7,14: NH³

A 3-as peptid esetén a harmadik aminosavegység NH hidrogénje ellenállt leginkább az oldószer támadásának, a jel intenzitása az ^1H spektrumban 10 óra után is jól látható volt. NH^4 és NH^5 átfedésben található a spektrumban, így ezek együttesen kerültek követésre, átlaguk értelmezhető. A jelek intenzitása kb. 10 óra után csökkent a zajszintig. A követett hidrogénatomok közül NH^2 jel cserélt le deutériumra leggyorsabban, kb. 4 óra alatt. (47. ábra)



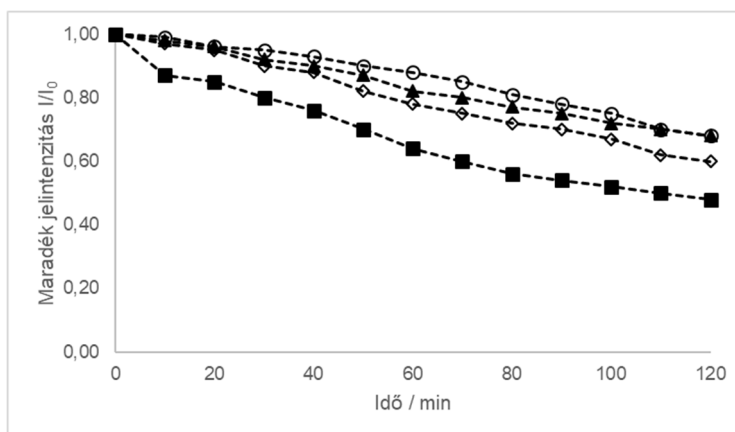
47. Ábra: A 3-as vegyület NH-ND csere diagramja; 4 mM; 298K
 ■: NH_2 ; ○: NH_3 ; *: NH_4+NH_5 .

4 esetén az előzőben leírtaknál gyorsabb cserét detektáltunk. Itt az NH^2 , NH^4 , NH^5 hidrogének kb. 3 óra alatt cseréltek le deutériumra. Itt is az NH^3 hidrogén relatív védettségét tapasztaltuk, az ^1H spektrumban a jele kb. 6 óra alatt csökkent a detektálhatóság határa alá. (48. ábra)



48. Ábra: A 4-es vegyület NH-ND csere diagramja; 4 mM; 298K
 ■: NH₂; ○: NH₃; ▲: NH₄; ◇: NH₅

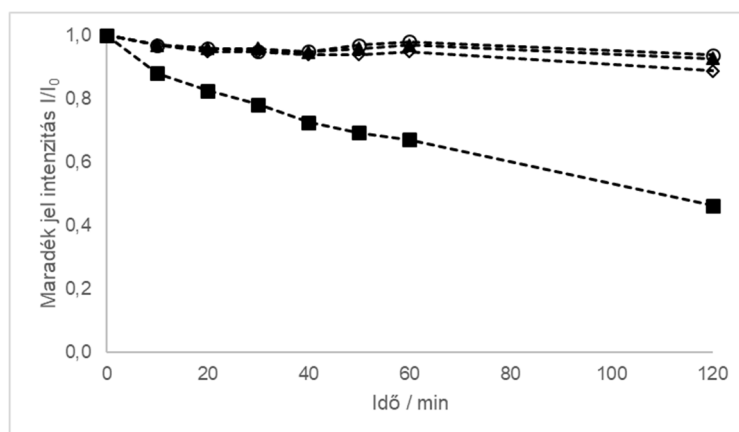
Az 5-ös vegyület esetén is a rendezett struktúrára jellemző lassabb deutériumcsere-t detektáltuk. Az amid NH hidrogénatomok jelei 10 óra után is jól azonosíthatók maradtak. A cserek sebességének sorrendje azonos az előzőekkel: a legvédettebb hidrogén az NH³, majd NH⁴, NH⁵ és leggyorsabban cserélt az NH². (49. ábra)



49. Ábra: Az 5-ös vegyület NH-ND csere diagramja; 4 mM; 298K
 ■: NH₂; ○: NH₃; ▲: NH₄; ◇: NH₅

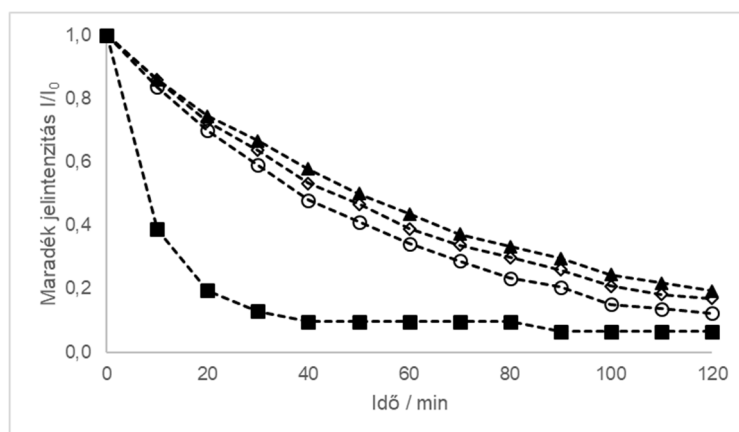
A másik ABHEC enantiomert tartalmazó 7-es vegyület esetén minden hidrogénatom esetén a beoldás után szinte azonnali deutériumcsere-t azonosítottunk, az amidsoporthoz könnyen hozzáfértek az oldószermolekulák.

Az oxigéntartalmú **6-os** vegyület esetén NH^3 , NH^4 és NH^5 hidrogénatomok védettsége olyan nagymértékű volt, hogy 24 óra alatt is csak minimális csere következett be, az NH jelek intenzitása alig változott. NH^2 cseréje itt is gyorsabban bekövetkezett, de 10 óránál hosszabb időt igényelt az amid NH cseréje. (50. ábra) A szintén oxigéntartalmú **8-as** vegyület esetén a fenti amid NH hidrogének cseréje kb. 3 órán belül zajlott le. (46., 51. ábra)



50. Ábra: A **6-os** vegyület NH-ND csere diagramja; 4 mM; 298K

■: NH_2 ; ○: NH_3 ; ▲: NH_4 ; ◊: NH_5



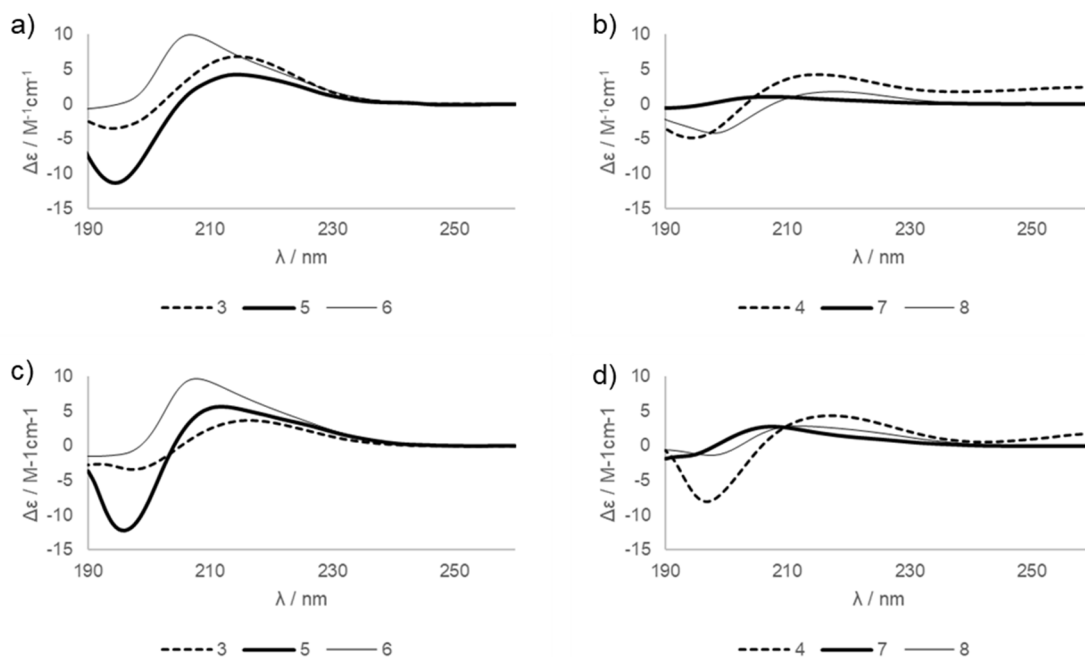
51. Ábra: A **8-as** vegyület NH-ND csere diagramja; 4 mM; 298K

■: NH_2 ; ○: NH_3 ; ▲: NH_4 ; ◊: NH_5

4.2.2.3. ECD vizsgálatok

Elektronikus cirkuláris dikroizmus vizsgálatainkat vízben és metanolban végeztük. Ez a vizsgálati módszer szintén a rendezett másodlagos szerkezetre ad bizonyító erejű információt.

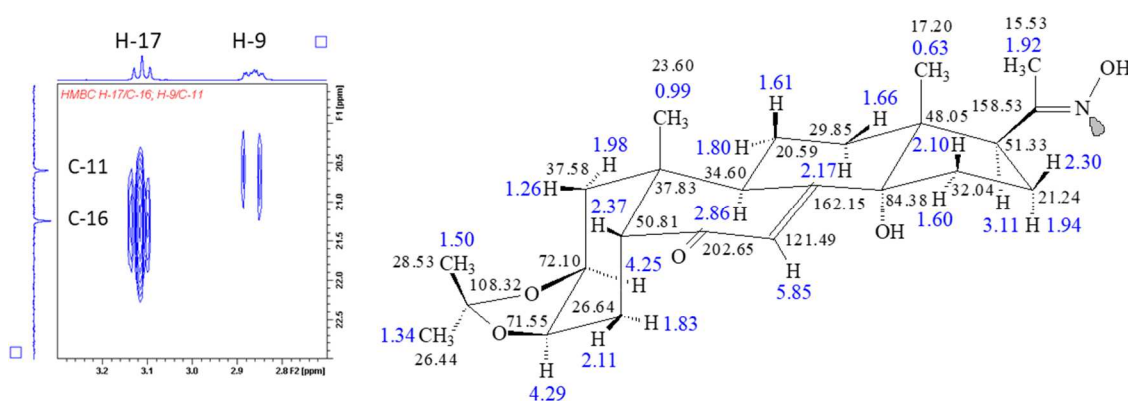
Mind a hat peptid esetén két széles CD sávot azonosítottunk a spektrumokban. Ezek helyzete a H14 hélixekre jellemző értékeknél jelentkezett: egy maximum 205 – 218 nm között és egy minimum 183 – 198 nm között. A maximum és a minimum intenzitása különbözött az egyes vegyületek esetén a konformáció stabilitásának függvényében. **3**, **5** és **6** esetén nagyobb intenzitásértékeket mértünk mint **4**, **7** és **8** esetén, összhangban az NMR spektroszkópiai vizsgálatok eredményeivel. (52. ábra)



52. Ábra: A vizsgált β -peptidek ECD spektrumai; 1 mM; 298K
 a), b) vízben
 c), d) metanolban

5. Megbeszélés

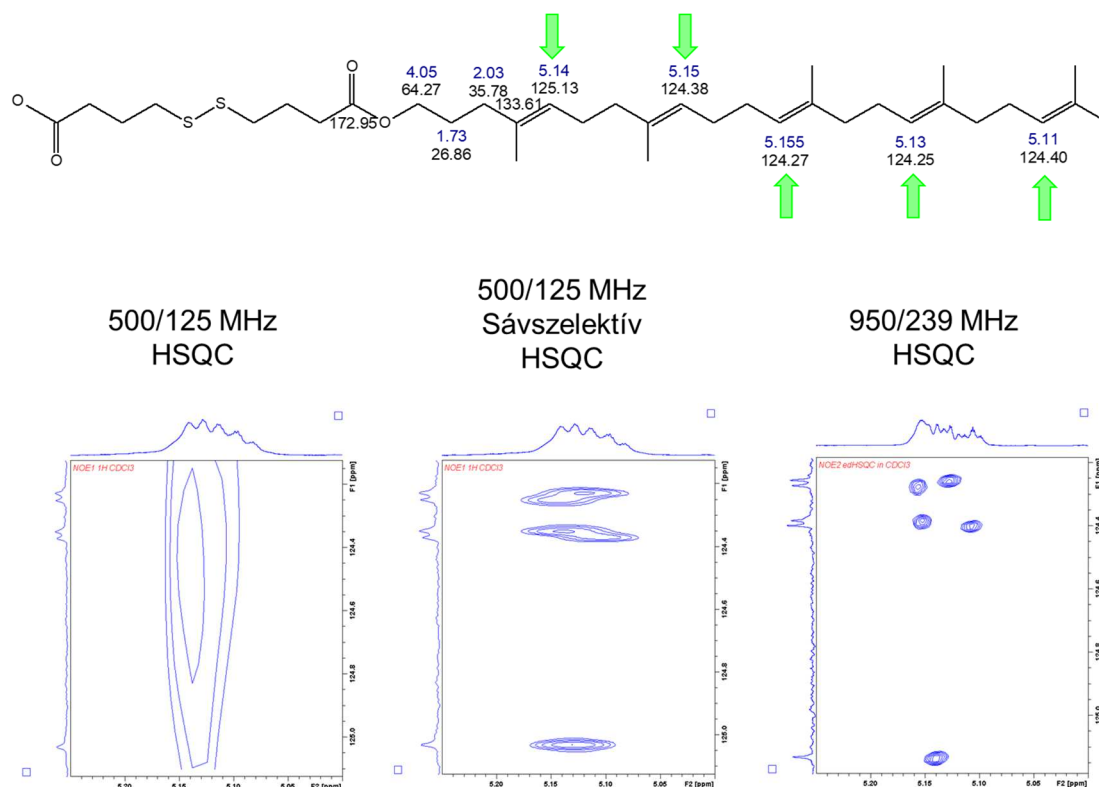
A posztsteron-2,3-acetonidok és ezek szkvalén konjugátumjainak teljes jelhozzárendelését elkészítettük, a diasztereotóp hidrogének és csoportok helyzetét leírtuk. Az ugyanazon szteroidból származó szkvalén-konjugátumok esetén a szteránváz azonos jelei minimális eltérést mutattak. Ugyanígy a szkvalén-molekulareszek kémiai eltolódásait összehasonlítva egyes származékokban szintén jó egyezést mutattak. A szabad ekdiszteroid vegyületek esetén a C-20 ^{13}C atom kémiai eltolódás változása $\Delta\delta=51$ ppm-mel egyértelműen jelezte a $\text{C}=\text{O} \rightarrow \text{C}=\text{NOH}$ átalakulást, amely érték összhangban van az irodalmi analógokkal. Az **1a** vegyületet leírták az irodalomban [42], röntgenkristallográfiai módszerrel igazolták az *E* izomert, CDCl_3 -ban készült oldatában leírták a jelek hozzárendelését. Ezt összevetettük az általunk készített hozzárendeléssel és eltérést tapasztaltunk. C-11 és C-16 esetén felcserélték a közleményben a kémiai eltolódás-értékeket. Közeli kémiai eltolódásokkal jellemezhető ^{13}C atomok, de az általunk felvett HMBC kísérletben egyértelműen megkülönböztethetők. H-9 kijelöli C-11-et, H-17 jeltől pedig korreláció vezet C-16 jelhez; amely keresztcúcsok megadták a helyes jelhozzárendelést. (53. ábra) Az irodalomban szereplő leírást a javítás mellett kiegészítettük a diasztereotóp hidrogének megkülönböztetett leírásával is.



53. Ábra: A helyes jelhozzárendelést bizonyító spektrumrészlet és az általunk leírt jelhozzárendelés **1a** vegyületre vonatkozóan; 500 MHz

A fentiekből is látható, hogy az egyértelmű jelhozzárendeléshez szükséges a megfelelő digitális felbontás, a jelek szétválása. Első kísérleteinkben, 500/125 MHz frekvencián végeztük kísérleteinket. Elsősorban a szkvalén-oldalláncban, az ismétlődő

molekulareszek jelhozzárendelésénél ütköztük bizonytalanságba a nem elegendő felbontás miatt. A HSQC mérések esetén a digitális felbontás az első kísérletekben az F1 dimenzióban 13,38 – 13,87 Hz/pont érték volt, a sávselektív technika és kisebb spektrumablak alkalmazásával 0,74 – 3,12 Hz/pont értéket sikerült elérni, amely közelítőleg 5 – 19x felbontásnövekedést jelent. A 950/239 MHz térerősségen mért HSQC spektrum 3,51 Hz/pont értékű felbontással készült, az eredeti kísérletünkhöz képest kb. 4x felbontásnövekedést sikerült elérni az indirekt dimenzióban. HMBC kísérletekben első alkalommal az 500/125 MHz készüléken 23,70 – 39,4 Hz/pont felbontással készültek a spektrumok. Ugyanezen a készüléken a sávselektív pulzusszekvencia és kisebb spektrumablak alkalmazása 0,45 – 2,94 Hz/pont felbontásértéket eredményezett, amely 52 – 88x-os javulás. A 950/239 MHz készüléken 11,63 Hz/pont felbontással vettük fel a spektrumot, így 2 – 3x-os felbontásnövekedést sikerült elérni. A közeli kémiai eltolódású csoportok megkülönböztetése így lehetővé vált. (54. ábra)



54. Ábra: A szkvalén-oldallánc sp^2 CH csoportjainak megkülönböztetése HSQC spektrumban

Ahhoz, hogy oldatfázisban tájékozódhassunk a vizsgált oxim vegyületek izomériájáról, szintén NMR spektroszkópai módszereket alkalmaztunk. Az

oximvegyületben nem volt lehetőségünk az $\text{NOH} \leftrightarrow \text{H}_3\text{-21 NOE}$ -térközelség kimérésére a kiszélesedett OH jel miatt és az egyetlen jelen levő jelsorozat nem adott lehetőséget a $\Delta\delta_{\text{syn-anti}}$ paraméter vizsgálatára C-21 kémiai eltolódására vonatkozóan. Az oxim metiléter vizsgálata megoldást nyújtott a konfiguráció meghatározására. Így már kimérhetővé vált az $\text{NOCH}_3 \leftrightarrow \text{CH}_3\text{-21 NOE}$ interakció, és két jelsorozat jelent meg a spektrumban 95% - 5% arányban. Mind a ROESY, mind a $\Delta\delta_{\text{syn-anti}}$ paraméter vizsgálata az *E* izomer domináns jelenlétét állapította meg. Az *E* izomerben a C-21 kémiai eltolódás 16,02 ppm, míg a *Z* izomerben 20,26 ppm volt, a $\Delta\delta_{\text{syn-anti}}$ paraméter így 4,24 ppm, amely jó összhangban van az irodalommal. [43] Az **1a-c** vegyületek oldatában egy jelsorozatot detektáltunk a következő kémiai eltolódásértékekkel a C-21 atomra vonatkozóan: 15,53 ppm, 17,48 ppm és 17,44 ppm. Ezek az értékek az *E* izomer kémiai eltolódásával korrelálnak, ezáltal az *E* izomert állapítottuk meg a vizsgált oxim típusú vegyületek konfigurációjaként.

A szkvalén-konjugátumok a D_2O -ban készült minta megjelenése és NMR spektrumai alapján nagyobb asszociátumokként azonosíthatók. Két módszerrel állapítottuk meg a szupramolekuláris szerkezetben résztvevő monomerek számát. A két eredmény eltérést mutatott (1000 vs. 2600 tagszám, 9,28 nm hidrodinamikai átmérő), amely monomer és a részecske ideális gömbként való kezeléséből adódhatott. Az irodalomban leírt ekdiszteroid-szkvalén konjugátum ennél jóval nagyobb átmérővel (200 – 300 nm) került leírásra DLS és TEM módszerek alapján. Ebből az feltételezhető, hogy a nagy méretű részecskék kisebb szubpartikuláris részekből állnak, amelyeket a DOSY NMR kísérletekben azonosítottunk.

A β -peptidek gerincjeleinek hozzárendelése során megfelelő diszperzióval jelentkeztek az NH jelek az ^1H spektrumban, amely a rendezett másodlagos szerkezet egyik jellemzője. Az NH C_αH és C_βH hidrogéneket a várt tartományokban azonosítottuk, a részletes konformációvizsgálatban felhasználtuk a térközelségben levő csoportok azonosításához.

Az önrendeződés vizsgálatát részletesen elvégeztük a hat vizsgált β -peptid pentamer esetén. A ROESY kísérletekben **3**, **5** és **6** vegyületekben találtunk a rendezett konformációra jellemző NOE-térközelségeket. Az irodalomban megadott karakterisztikus térközelségek közül az $\text{NH}^i - \text{C}_\alpha\text{H}^{i+2}$ és $\text{C}_\alpha\text{H}^i - \text{C}_\beta\text{H}^{i+2}$ korrelációt azonosítottuk ezekben. A modellezett szerkezetben[139] mérve az adott hidrogénatomok

távolságát, mind 3 Å távolságon belülnek adódott. A **4**, **7** és **8** vegyületek csak kis intenzitású keresztcsúcsokat adtak metanolban, így ezek esetében a kevésbé stabil másodlagos szerkezetet állapíthatjuk meg a ROESY NMR vizsgálatok alapján. Vízben és DMSO-*d*₆-ban nem jelentek meg a korrelációk a rendezett formára vonatkozóan, ezekben a közegekben nem kedvező a rendezett szerkezet kialakulása az utóbbi három vegyületben.

Az előzőkkel összhangban vannak az amid NH-ND csere vizsgálatok eredményei. A **7** vegyület CH₃OH-ban készült oldatában azonnal bekövetkezett a csere, amelyből a rendezetlen konformáció jelenlétére következtethetünk. A **4** és **8** vegyületek esetén egy órán belül bekövetkezett az amid NH hidrogének cserélődése deutériumra, így ezekben gyenge H-hidas szerkezetek azonosíthatók. Jelentősen hosszabb idő (10 óra, 1 nap) volt szükséges a **3**, **5** és **6** vegyületek amid NH-ND cseréjéhez, így itt stabil, H-hidak által kialakított másodlagos szerkezetekként vannak jelen a peptidláncok, az amidcsoportok az oldószertől védetten helyezkednek el. Ezen megfigyelések alátámasztják a ROESY mérésekből kapott eredményeket.

A metanolban és vízben felvett intenzív CD spektrumok szintén a **3**, **5** és **6** vegyületek esetén H14 hélix kialakulását igazolták. A CD sávok csökkent intenzitása **4**, **7** és **8** vegyületekben a hélixes másodlagos szerkezet kis stabilitását mutatják. Minimális eltérést tapasztaltunk vízben és metanolban végezve a vizsgálatot, az oldószer nem befolyásolta döntően a konformációt.

6. Következtetések

Az ekdiszteroid és konjugátumaik esetén az azonos szteroidegységben vagy a szkvalén-linker-oldallánc egységben a kémiai eltolódások minimális különbséggel detektálhatók. Az jövőben újonnan előállítandó szkvalén-konjugátumok jelhozzárendelése ezáltal gyorsabban lesz lehetséges. Az irodalom korábbi eredményeinek sorába illeszkedve, újabb $\Delta\delta_{syn-anti}$ paramétert adtunk meg egy oxim-típusú vegyület C_α atomjára vonatkozóan és megadtunk egy biztos kombinált szintetikus-NMR spektroszkópiai módszert a konfiguráció megállapításához.

A szkvalén-konjugátumok esetén igazolható a várt asszociátumképződés D_2O -ban. A másodlagos szerkezet részletes vizsgálatára nem volt lehetőségünk a nanoasszociátum-képződés miatt. DOSY mérések által egy kb. 1000 tagszámú részecske került azonosításra. Mérete a nanorészecskék tartományában helyezkedik el. Irodalomban eddig nem történt meg ilyen típusú asszociátumok NMR spektroszkópiai azonosítása, eredményeinkkel rávilágítottunk egy módszerre, amely sikeresen használható oldatban jelen levő szkvalén-konjugátum részecskék vizsgálatára.

A β -peptidek másodlagos szerkezetének vizsgálata során azt találtuk, hogy a *transz*-ACHC-láncba egy eltérő β -aminosav beépülése döntően befolyásolja a rendezett konformer kialakulását. A flexibilis β -alanin építőelem nem befolyásolta a *transz*-ACHC-ből felépülő β -peptidek H14 hélixének kialakulását. Ezzel szemben a rigid, telítetlen *Z*-dehidro- β -alanin megakadályozta a rendezett szerkezet jelenlétét, mely lehetséges oka a $C=C$ kettős kötés konjugációja a szomszédos amid kötésekkel. Ciklusos β -aminosavakon végzett vizsgálataink alapján a konfigurációnak meghatározó szerepe van a heterooligomerekben lehetséges helikális struktúrára. [1*R*,2*R*,3*S*,4*S*]-*diexo*-ABHEC és [1*R*,2*S*,3*R*,4*S*]-*diexo*-AOBHEC középső aminosavként való beépülése esetén kialakulhatott a H14 hélix. Azonban ugyanezen aminosavak enantiomerjeit, mint [1*S*,2*S*,3*R*,4*R*]-*diexo*-ABHEC és [1*S*,2*R*,3*S*,4*R*]-*diexo*-AOBHEC, tartalmazó β -peptid szekvenciák stabil önrendeződésre nem képesek. Eredményeink alapján elmondható, hogy a *transz*-ACHC stabil H14 hélix konformációját meg lehet szüntetni egyes aminosavak beépítésével, míg más aminosavegységek nem befolyásolják ezt. Az ABHEC és AOBHEC egységek beépülésének összehasonlításával az *O*-atomhoz kapcsolható hatást nem találtunk. Újabb peptidek tervezésénél ez az információ felhasználható a kiépíteni kívánt másodlagos szerkezet érdekében.

7. Összefoglalás

PhD munkám során mesterséges, önrendeződő rendszerek két típusát vizsgáltam: szkvalén-konjugátumokat és β -peptideket. Vizsgálatainkban az egyes rendszerek jelhozzárendelését végeztük el NMR spektroszkópiával, majd a vegyületek önrendeződését tanulmányoztuk.

Két ekdiszteroid vegyületet (posztszteron-2,3-acetonidok) és ezek szkvalén-konjugátumait vizsgáltuk két különböző linker szakasz beépítésével. A hat vegyületre teljes ^1H és ^{13}C jelhozzárendelést írtunk le, a szteránváz esetén a diasztereotóp hidrogének megkülönböztetésével, és igazoltuk a hosszú lipofil oldallánc jelenlétét. Az oximvegyületek esetében igazoltuk a $\text{C}=\text{N}$ kettőskötés konfigurációját. Az oldalláncban található hasonló kémiai környezetben elhelyezkedő atomok/atomcsoportok megkülönböztetése kihívást képező feladat volt. Ultranagy térerejű mérésekkel és sávselektív pulzusszekvenciákkal elért extrém nagy felbontású HMBC és HSQC keresztcsúcsok segítségével egyértelmű teljes jelhozzárendelést írtunk le a vizsgált vegyületekre vonatkozóan. Az önrendeződés csak szupramolekuláris szinten volt tanulmányozható, igazoltuk a nano mérettartományú asszociátum képződését.

A β -peptidek esetén olyan pentamer rendszereket vizsgáltunk, amelyek *transz*-[1*R*,2*R*]-ACHC (*transz*-[1*R*,2*R*]-aminociklohexánkarbonsav) aminosav egységekből álltak és hat különböző aminosav egységet tartalmaztak harmadik aminosavként. A gerincprotonokat rendeltük hozzá az egyes csoportokhoz, majd a másodlagos szerkezet tanulmányozása során három peptid esetén rendezett, stabil H14 hélixet, a további három peptid esetén kevésbé stabil helikális szerkezetet/rendezetlen konformációt azonosítottunk. Eredményeinket a NOE-térközelségek, amid NH-ND csere vizsgálatok és ECD felvételek igazolták. A flexibilis β -alanin építőelem, [1*R*,2*R*,3*S*,4*S*]-*diexo*-ABHEC ([1*R*,2*R*,3*S*,4*S*]-*diexo*-3-aminobiciklo[2.2.1]hept-5-én-2-karbonsav) és [1*R*,2*S*,3*R*,4*S*]-*diexo*-AOBHEC ([1*R*,2*S*,3*R*,4*S*]-*diexo*-3-amino-7-oxabiciklo[2.2.1]hept-5-én-2-karbonsav) építőegységek esetén kialakult a rendezett szerkezet. A rigid, telítetlen *Z*-dehidro- β -alanin, [1*S*,2*S*,3*R*,4*R*]-*diexo*-ABHEC és [1*S*,2*R*,3*S*,4*R*]-*diexo*-AOBHEC megakadályozta a rendezett szerkezet jelenlétét.

8. Summary

During my PhD work two types of self-associating systems were investigated: squalene-conjugates and β -peptides. Structure elucidation was made by NMR spectroscopy, then the self-association was studied.

Two ecdysteroids (posterone-2,3-acetonides) and their squalenoylated derivatives were investigated with two different linker regions. Complete ^1H and ^{13}C assignment for the six compounds were made, in case of the steroid moiety the diastereotopic groups were distinguished and the presence of the squalene-linker side chain was verified. The configuration of C=N double bond in oximes was also determined. It was a challenging task to differentiate the atoms/groups which are in very similar chemical environment. With the help of extreme high resolution HMBC and HSQC spectra by ultra-high magnetic field and band-selective pulse sequences the complete assignment was performed for these compounds. The self-association was investigated on supramolecular level, the self-assembly was found in form of nanomaterials in aqueous solution.

β -peptide pentamers which are made from *trans*-[1*R*,2*R*]-ACHC (*trans*-2-[1*R*,2*R*]-aminocyclohexanecarboxylic acid) residues and six different β -amino acids as 3rd unit were studied. Backbone protons were assigned, then the secondary structures were determined. In three peptides stable H14 helix was formed, in further three peptides less stable structures were identified. NOE-correlations, amide NH-ND exchange and ECD measurements were carried out for the investigation of the conformation. In case of the flexible β -alanine building block, [1*R*,2*R*,3*S*,4*S*]-*diexo*-ABHEC ([1*R*,2*R*,3*S*,4*S*]-*diexo*-3-aminobicyclo[2.2.1]hept-5-ene-2-carboxylic acid) and [1*R*,2*S*,3*R*,4*S*]-*diexo*-AOBHEC ([1*R*,2*S*,3*R*,4*S*]-*diexo*-3-amino-7-oxabicyclo[2.2.1]hept-5-ene-2-carboxylic acid) residues stable helices were discovered. Differences were found for [1*S*,2*S*,3*R*,4*R*]-*diexo*-ABHEC, [1*S*,2*R*,3*S*,4*R*]-*diexo*-AOBHEC and Z- β -dehydroalanine as middle unit, stable self-organization could not be observed.

9. Irodalomjegyzék

1. Goodwin TW, Horn DHS, Karlson P, Koolman J, Nakanishi K, Robbins WE, Siddall JB, Takemoto T. (1978), Ecdysteroids: a new generic term. *Nature*, 272: 122.
2. Lafont R, Horn DHS. In: (szerk.), *Ecdysone: from Chemistry to Mode of Action*. Thieme Verlag, Stuttgart, 1989: 39-64.
3. Lafont R, Harmatha J, Frédéric M-P, Dinan L, Wilson ID. *The Ecdysone Handbook*. <http://ecdybase.org/>: (2019. 02. 22.).
4. Dinan L. *Ecdysteroid Structure-Activity Relationships*. Elsevier, Amsterdam, 2003: 71-88.
5. Kasal A. *Structure and Nomenclature of Steroids*. In: Makin H, Gower D (szerk.), *Steroid Analysis*. Springer Netherlands, Dordrecht, 2010: 1-25.
6. Hikino H, Nomoto K, Takemoto T. (1970), Poststerone, a metabolite of insect metamorphosing substances from *Cyathula capitata*. *Steroids*, 16: 393-400.
7. Duax W, Norton De. *Atlas of Steroid Structure*. Plenum, New York, 1975: 63-90.
8. Kasal A, Budesinsky M, Griffiths WJ. *Spectroscopic Methods of Steroid Analysis*. In: Makin H, Gower D (szerk.), *Steroid Analysis*. Springer, Dordrecht, 2010: 21-36.
9. *Steroid Structural Analysis by Two-Dimensional NMR*. VCH, New York, 1994.
10. McNaught AD, Wilkinson A. IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). WileyBlackwell, Oxford, 1997: 55.
11. Glasstone S. *Text-Book of Physical Chemistry*. Van Nostrand, New York, 1940: 322-330.
12. Allen FH, Kennard O, Watson DG, Brammer L, Orpen AG, Taylor R. (1987), Tables of bond lengths determined by X-ray and neutron diffraction. Part 1. Bond lengths in organic compounds. *J Chem Soc*: S1-S19.
13. Politzer P, Murray JS. *Structural analysis of hydroxylamines, oximes and hydroxamic acids: Trends and patterns*. In: Rappoport Z, Liebman JF (szerk.), *The chemistry of Hydroxylamines, Oximes and Hydroxamic Acids*. Wiley, Chichester, 2009: 29-52.

14. Bertolasi V, Gilli G, Veronese AC. (1982), Structures of E,E-3-(p-tolylimino)-2-butanone oxime and E,Z-4-(p-tolylimino)-2,3-pentanedione 3-oxime. An X-ray crystallographic investigation on bonding in oximes. *Acta Crystallogr Sect B: Struct Sci*, 38: 502-511.
15. Shagun VA, Vasil'tsov AM, Ivanov AV, Mikhaleva AI, Trofimov BA. (2013), A quantum chemical study of the mechanism of the regioselective domino-reaction of O-vinyl-2-tetralone oxime. *J Struct Chem*, 54: 17-25.
16. Tenant G. Imines, nitrones, nitriles and isocyanides. In: Barton D., D. OW (szerk.), *Comprehensive Organic Chemistry*. Pergamon, New York, 1979: 561.
17. Gawley RE, Nagy T. (1984), Alkylation of aldehyde oxime dianions. *Tetrahedron Lett*, 25: 263-264.
18. Karabatsos GJ, Taller RA. (1968), Structural studies by nuclear magnetic resonance—XV: Conformations and configurations of oximes. *Tetrahedron*, 24: 3347-3360.
19. Andrzejewska A, Lapinski L, Reva I, Fausto R. (2002), Matrix isolation FTIR and molecular orbital study of E and Z acetaldoxime monomers. *PCCP*, 4: 3289-3296.
20. Caldeira MM, Gil VMS. (1976), Self-association and relative stability of the isomeric structures of acetaldoxime. *Tetrahedron*, 32: 2613-2615.
21. Glaser R, Streitwieser A. (1989), Configurational and conformational preferences in oximes and oxime carbanions. Ab initio study of the syn effect in reactions of oxyimine enolate equivalents. *J Am Chem Soc*, 111: 7340-7348.
22. Holloway CE, Vuik CPJ. (1979), Kinetics of Z-E isomerisation of acetaldoxime. *Tetrahedron Lett*, 20: 1017-1020.
23. Rosenberg S, Silver SM, Sayer JM, Jencks WP. (1974), Evidence for two concurrent mechanisms and a kinetically significant proton transfer process in acid-catalyzed O-methyloxime formation. *J Am Chem Soc*, 96: 7986-7998.
24. Long JA, Harris NJ, Lammertsma K. (2001), Formaldehyde Oxime \rightleftharpoons Nitrosomethane Tautomerism. *J Org Chem*, 66: 6762-6767.
25. Nagy PI, Kökösi J, Gergely A, Rácz Á. (2003), Theoretical Conformational Analysis for Codeinone-6-oximes in Gas Phase and in Solution. *J Phys Chem*, 107: 7861-7868.

26. Huang M, Duan W-G, Lin G-S, Li K, Hu Q. (2017), Synthesis and Antifungal Activity of Novel 3-Caren-5-One Oxime Esters. *Molecules*, 22: 1538.
27. Tian Y, Lu L, Chang Y, Zhang D-s, Li J, Feng Y-C, Hu C-Q. (2015), Identification of a new isomer from a reversible isomerization of ceftriaxone in aqueous solution. *J Pharm Biomed Anal*, 102: 326-330.
28. Zhang J, Qian J, Tong J, Zhang D, Hu C. (2013), Toxic Effects of Cephalosporins with Specific Functional Groups as Indicated by Zebrafish Embryo Toxicity Testing. *Chem Res Toxicol*, 26: 1168-1181.
29. Cefepime dihydrochloride monohydrate monograph. In: Europe Co (szerk.), *European pharmacopoeia 9.0*. Council of Europe, Strasbourg, 2016: 1981-1982.
30. Cefixime monograph. In: Europe Co (szerk.), *European pharmacopoeia 9.0*. Council of Europe, Strasbourg, 2016: 1983-1984.
31. Cefpodoxime proxetil. In: Europe Co (szerk.), *European pharmacopoeia 9.0*. Council of Europe, Strasbourg, 2016: 1989-1991.
32. Ceftazidime pentahydrate monograph. In: Europe Co (szerk.), *European pharmacopoeia 9.0*. Council of Europe, Strasbourg, 2016: 1996-1998.
33. Ceftriaxone sodium. In: Europe Co (szerk.), *European Pharmacopoeia 9.0*. Council of Europe, Strasbourg, 2016: 2000-2001.
34. Cefuroxime axetil monograph. In: Europe Co (szerk.), *European Pharmacopoeia 9.0*. Council of Europe, Strasbourg, 2016: 2001-2002.
35. Cefuroxime sodium monograph. In: Europe Co (szerk.), *European Pharmacopoeia 9.0*. Council of Europe, Strasbourg, 2016: 2003-2004.
36. Fluvoxamine maleate monograph. In: Europe Co (szerk.), *European Pharmacopoeia 9.0*. Council of Europe, Strasbourg, 2016: 2523-2524.
37. Roxithromycin monograph. In: Europe Co (szerk.), *European Pharmacopoeia*. Council of Europe, Strasbourg, 2016: 3513-3516.
38. Norgestimate monograph. In: Europe Co (szerk.), *European Pharmacopoeia 9.0*. Council of Europe, Strasbourg, 2016: 3184-3185.
39. Afonin AV, Ushakov IA, Tarasova OA, Shmidt EY, Mikhaleva AI, Voronov VK. (2000), Simple procedure for determination of configuration of ketone oximes and their derivatives by ¹³C NMR spectroscopy. *Russ J Org Chem*, 36: 1777-1783.

40. Galyautdinov IV, Ves'kina NA, Afon'kina SR, Khalilov LM, Odínokov VN. (2006), Synthesis of 20-hydroxyecdysone oxime, its diacetone, and their 14,15-anhydro derivatives. *Russ J Org Chem*, 42: 1333-1339.
41. Kovganko NV, Ananich SK, Sokolov SN, Chernov YG. (2012), Synthesis of the O-(2-chloropyridin-5-ylmethyl)oxime of 20-hydroxyecdysone. *Chem Nat Compd*, 47: 944-946.
42. Savchenko RG, Kostyleva SA, Meshcheryakova ES, Khalilov LM, Parfenova LV, Odínokov VN. (2016), Synthesis of novel α -aminoecdysteroids via regio- and stereoselective oximation/hydrogenation of 20-hydroxyecdysone derivatives. *Can J Chem*, 95: 130-133.
43. Vágvölgyi M, Martins A, Kulmány Á, Zupkó I, Gáti T, Simon A, Tóth G, Hunyadi A. (2018), Nitrogen-containing ecdysteroid derivatives vs. multi-drug resistance in cancer: Preparation and antitumor activity of oximes, oxime ethers and a lactam. *Eur J Med Chem*, 144: 730-739.
44. Becker ED. Chapter 10 - Two-Dimensional NMR. In: Becker ED (szerk.), *High Resolution NMR (Third Edition)*. Academic Press, San Diego, 2000: 251-278.
45. Chen S, Shen F, Liu S. (2014), Synthesis of some novel 4-acyl-3-oxo-4-aza-5-pregnene-20E-oxime ester derivatives as potent 5α reductase inhibitors. *J Chem Res*, 38: 334-336.
46. Huang M, Duan WG, Lin GS, Li K, Hu Q. (2017), Synthesis and Antifungal Activity of Novel 3-Carene-5-One Oxime Esters. *Molecules*, 22: E1538.
47. Lergenmüller M, Kläres U, Lichtenthaler FW. (2009), E versus Z geometry in β -d-arabino-hexopyranosidulose oximes. *Carbohydr Res*, 344: 2127-2136.
48. Martsynkevich M, Zakharychev V, Sharanina I. (2011), Synthesis of N,N-Disubstituted (Z)-O-Methylnicotinamide Oximes. *Russ Chem Bull*, 60: 521.
49. Onoue S, Yamada S, Chan H-K. (2014), Nanodrugs: pharmacokinetics and safety. *Int J Nanomedicine*, 9: 1025-1037.
50. Desmaële D, Gref R, Couvreur P. (2012), Squalenoylation: A generic platform for nanoparticulate drug delivery. *J Control Release*, 161: 609-618.
51. Caron J, Maksimenko A, Wack S, Lepeltier E, Bourgaux C, Morvan E, Leblanc K, Couvreur P, Desmaële D. (2013), Improving the Antitumor Activity of

- Squalenoyl-Paclitaxel Conjugate Nanoassemblies by Manipulating the Linker between Paclitaxel and Squalene. *Adv Healthc Mater*, 2: 172-185.
52. Dosio F, Reddy LH, Ferrero A, Stella B, Cattel L, Couvreur P. (2010), Novel Nanoassemblies Composed of Squalenoyl-Paclitaxel Derivatives: Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation. *Bioconj Chem*, 21: 1349-1361.
 53. Fumagalli G, Marucci C, Christodoulou MS, Stella B, Dosio F, Passarella D. (2016), Self-assembly drug conjugates for anticancer treatment. *Drug Discov Today*, 21: 1321-1329.
 54. Borrelli S, Christodoulou MS, Ficarra I, Silvani A, Cappelletti G, Cartelli D, Damia G, Ricci F, Zucchetti M, Dosio F, Passarella D. (2014), New class of squalene-based releasable nanoassemblies of paclitaxel, podophyllotoxin, camptothecin and epothilone A. *Eur J Med Chem*, 6: 179-190.
 55. Maksimenko A, Mougin J, Mura S, Sliwinski E, Lepeltier E, Bourgaux C, Lepêtre S, Zouhiri F, Desmaële D, Couvreur P. (2013), Polyisoprenoyl gemcitabine conjugates self assemble as nanoparticles, useful for cancer therapy. *Cancer Lett*, 334: 346-353.
 56. Reddy LH, Khoury H, Paci A, Deroussent A, Ferreira H, Dubernet C, Declèves X, Besnard M, Chacun H, Lepêtre-Mouelhi S, Desmaële D, Rousseau B, Laugier C, Cintrat J-C, Vassal G, Couvreur P. (2008), Squalenoylation Favorably Modifies the in Vivo Pharmacokinetics and Biodistribution of Gemcitabine in Mice. *Drug Metab Disposition*, 36: 1570.
 57. Sémiramoth N, Meo CD, Zouhiri F, Saïd-Hassane F, Valetti S, Gorges R, Nicolas V, Poupaert JH, Chollet-Martin S, Desmaële D, Gref R, Couvreur P. (2012), Self-Assembled Squalenoylated Penicillin Bioconjugates: An Original Approach for the Treatment of Intracellular Infections. *ACS Nano*, 6: 3820-3831.
 58. Sarpietro MG, Micieli D, Rocco F, Ceruti M, Castelli F. (2009), Conjugation of squalene to acyclovir improves the affinity for biomembrane models. *Int J Pharm*, 382: 73-79.
 59. Heras B, Rodríguez B, Boscá L, M Villar A. (2003), Terpenoids: Sources, Structure Elucidation and Therapeutic Potential in Inflammation. *Curr Top Med Chem*, 3: 171-185.

60. Yadava N, Yadava R, Goyalb A. (2014), Chemistry of Terpenoids. *Int J Pharm Sci Res*, 27: 272-278.
61. Ernst J, Sheldrick WS, Fuhrhop J-H. (1976), The Crystal Structure of Squalene. *Angew Chem Int Ed*, 15: 778-778.
62. Van Tamelen EE. (1968), Bioorganic chemistry: sterols and acrylic terpene terminal epoxides. *Acc Chem Res*, 1: 111-120.
63. Ghimire GP, Thuan NH, Koirala N, Sohng JK. (2016), Advances in Biochemistry and Microbial Production of Squalene and Its Derivatives. *J Microbiol Biotechnol*, 26: 441–451.
64. Spanova M, Daum G. (2011), Squalene – biochemistry, molecular biology, process biotechnology, and applications. *Eur J Lipid Sci Technol*, 113: 1299-1320.
65. Woodward RB, Bloch K. (1953), The cyclization of squalene in cholesterol synthesis. *J Am Chem Soc*, 75: 2023-2024.
66. Smith TJ. (2000), Squalene: potential chemopreventive agent AU - Smith, Theresa J. *Expert Opin Investig Drugs*, 9: 1841-1848.
67. Lepeltier E, Bourgaux C, Rosilio V, Poupaert JH, Meneau F, Zouhiri F, Lepêtre-Mouelhi S, Desmaële D, Couvreur P. (2013), Self-Assembly of Squalene-Based Nucleolipids: Relating the Chemical Structure of the Bioconjugates to the Architecture of the Nanoparticles. *Langmuir*, 29: 14795-14803.
68. Caron J, Lepeltier E, Reddy LH, Lepêtre-Mouelhi S, Wack S, Bourgaux C, Couvreur P, Desmaële D. (2011), Squalenoyl Gemcitabine Monophosphate: Synthesis, Characterisation of Nanoassemblies and Biological Evaluation (*Eur. J. Org. Chem.* 14/2011). *Eur J Org Chem*, 2011.
69. Couvreur P. Squalenoylation: A Novel Technology for Anticancer and Antibiotic Drugs with Enhanced Activity. In: Lourtioz J-M, Lahmani M, Dupas-Haeberlin C, Hesto P (szerk.), *Nanosciences and Nanotechnology: Evolution or Revolution?* Springer, Heidelberg, 2016: 253-272.
70. Bekkara-Aounallah F, Gref R, Othman M, Reddy LH, Pili B, Allain V, Bourgaux C, Hillaireau H, Lepêtre-Mouelhi S, Desmaële D, Nicolas J, Chafi N, Couvreur P. (2008), Novel PEGylated Nanoassemblies Made of Self-Assembled Squalenoyl Nucleoside Analogues. *Adv Funct Mater*, 18: 3715-3725.

71. Couvreur P, Reddy LH, Mangenot S, Poupaert JH, Desmaële D, Lepître-Mouelhi S, Pili B, Bourgaux C, Amenitsch H, Ollivon M. (2008), Discovery of New Hexagonal Supramolecular Nanostructures Formed by Squalenylation of an Anticancer Nucleoside Analogue. *Small*, 4: 247-253.
72. Fumagalli G, Giorgi G, Vágvölgyi M, Colombo E, Christodoulou MS, Collico V, Prosperi D, Dosio F, Hunyadi A, Montopoli M, Hyeraci M, Silvani A, Lesma G, Via LD, Passarella D. (2018), Heteronanoparticles by Self-Assembly of Ecdysteroid and Doxorubicin Conjugates To Overcome Cancer Resistance. *ACS Med Chem Lett*, 9: 468-471.
73. Gellman SH. (1998), Foldamers: A Manifesto. *Acc Chem Res*, 31: 173-180.
74. Hill DJ, Mio MJ, Prince RB, Hughes TS, Moore JS. (2001), A Field Guide to Foldamers. *Chem Rev*, 101: 3893-4012.
75. Otvos L, Wade JD. (2014), Current challenges in peptide-based drug discovery. *Front Chem*, 2: 1-4.
76. Qvit N, Rubin SJS, Urban TJ, Mochly-Rosen D, Gross ER. (2017), Peptidomimetic therapeutics: scientific approaches and opportunities. *Drug Discov Today*, 22: 454-462.
77. Seebach D, Beck AK, Bierbaum DJ. (2004), The World of β - and γ -Peptides Comprised of Homologated Proteinogenic Amino Acids and Other Components. *Chem Biodivers*, 1: 1111-1239.
78. Seebach D, Hook DF, Glättli A. (2006), Helices and other secondary structures of β - and γ -peptides. *Pept Sci*, 84: 23-37.
79. Fülöp F, Martinek TA, Tóth GK. (2006), Application of alicyclic β -amino acids in peptide chemistry. *Chem Soc Rev*, 35: 323-334.
80. Banerjee A, Balaram P. (1997), Stereochemistry of peptides and polypeptides containing omega amino acids. *Curr Sci*, 73: 1067-1077.
81. Appella DH, Christianson LA, Klein DA, Powell DR, Huang X, Barchi JJ, Gellman SH. (1997), Residue-based control of helix shape in β -peptide oligomers. *Nature*, 387: 381-384.
82. Krauthäuser S, Christianson LA, Powell DR, Gellman SH. (1997), Antiparallel Sheet Formation in β -Peptide Foldamers: Effects of β -Amino Acid Substitution on Conformational Preference¹. *J Am Chem Soc*, 119: 11719-11720.

83. Seebach D, Ciceri PE, Overhand M, Jaun B, Rigo D, Oberer L, Hommel U, Amstutz R, Widmer H. (1996), Probing the Helical Secondary Structure of Short-Chain β -Peptides. *Helv Chim Acta*, 79: 2043-2066.
84. Seebach D, Overhand M, Kühnle Florian NM, Martinoni B, Oberer L, Hommel U, Widmer H. (1996), β -Peptides: Synthesis by Arndt-Eistert homologation with concomitant peptide coupling. Structure determination by NMR and CD spectroscopy and by X-ray crystallography. Helical secondary structure of a β -hexapeptide in solution and its stability towards pepsin. *Helv Chim Acta*, 79: 913-941.
85. Cheng RP, DeGrado WF. (2001), De Novo Design of a Monomeric Helical β -Peptide Stabilized by Electrostatic Interactions. *J Am Chem Soc*, 123: 5162-5163.
86. Appella DH, Christianson LA, Karle IL, Powell DR, Gellman SH. (1996), β -Peptide Foldamers: Robust Helix Formation in a New Family of β -Amino Acid Oligomers. *J Am Chem Soc*, 118: 13071-13072.
87. Mándity IM, Fülöp L, Vass E, Tóth GK, Martinek TA, Fülöp F. (2010), Building β -Peptide H10/12 Foldamer Helices with Six-Membered Cyclic Side-Chains: Fine-Tuning of Folding and Self-Assembly. *Org Lett*, 12: 5584-5587.
88. Martinek TA, Mándity IM, Fülöp L, Tóth GK, Vass E, Hollósi M, Forró E, Fülöp F. (2006), Effects of the Alternating Backbone Configuration on the Secondary Structure and Self-Assembly of β -Peptides. *J Am Chem Soc*, 128: 13539-13544.
89. Mándity IM, Wéber E, Martinek TA, Olajos G, Tóth GK, Vass E, Fülöp F. (2009), Design of Peptidic Foldamer Helices: A Stereochemical Patterning Approach. *Angew Chem Int Ed*, 48: 2171-2175.
90. Cheng RP, Gellman SH, DeGrado WF. (2001), β -Peptides: From Structure to Function. *Chem Rev*, 101: 3219-3232.
91. Seebach D, Abele S, Gademann K, Guichard G, Hintermann T, Jaun B, Matthews JL, Schreiber JV, Oberer L, Hommel U, Widmer H. (1998), β 2- and β 3-Peptides with Proteinaceous Side Chains: Synthesis and solution structures of constitutional isomers, a novel helical secondary structure and the influence of solvation and hydrophobic interactions on folding. *Helv Chim Acta*, 81: 932-982.
92. Wu Y-D, Wang D-P. (1998), Theoretical Studies of β -Peptide Models. *J Am Chem Soc*, 120: 13485-13493.

93. Bode KA, Applequist J. (1997), Poly(β -amino acid) Helices. Theoretical π - π^* Absorption and Circular Dichroic Spectra. *Macromolecules*, 30: 2144-2150.
94. Hetényi A, Mándity IM, Martinek TA, Tóth GK, Fülöp F. (2005), Chain-Length-Dependent Helical Motifs and Self-Association of β -Peptides with Constrained Side Chains. *J Am Chem Soc*, 127: 547-553.
95. Kritzer JA, Tirado-Rives J, Hart SA, Lear JD, Jorgensen WL, Schepartz A. (2005), Relationship between Side Chain Structure and 14-Helix Stability of β 3-Peptides in Water. *J Am Chem Soc*, 127: 167-178.
96. Vaz E, Pomerantz WC, Geyer M, Gellman SH, Brunsveld L. (2008), Comparison of Design Strategies for Promotion of β -Peptide 14-Helix Stability in Water. *ChemBioChem*, 9: 2254-2259.
97. Johnson LM, Gellman SH. α -Helix Mimicry with α/β -Peptides. In: Keating AE (szerk.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, Boston, 2013: 407-429.
98. Chandrasekhar S, Babu BN, Prabhakar A, Sudhakar A, Reddy MS, Kiran MU, Jagadeesh B. (2006), Oligomers of cis- β -norbornene amino acid: Formation of β -strand mimetics. *Chem Commun*: 1548-1550.
99. Chandrasekhar S, Sudhakar A, Kiran MU, Babu BN, Jagadeesh B. (2008), β -Strand mimetics: formation of bend-strands in oligomers of enantiomeric β -amino acids. *Tetrahedron Lett*, 49: 7368-7371.
100. Doerksen RJ, Chen B, Yuan J, Winkler JD, Klein ML. (2003), Novel conformationally-constrained β -peptides characterized by ^1H NMR chemical shifts. *Chem Commun*: 2534-2535.
101. Christofferson AJ, Al-Garawi ZS, Todorova N, Turner J, Del Borgo MP, Serpell LC, Aguilar M-I, Yarovsky I. (2018), Identifying the Coiled-Coil Triple Helix Structure of β -Peptide Nanofibers at Atomic Resolution. *ACS Nano*, 12: 9101-9109.
102. Daniels DS, Petersson EJ, Qiu JX, Schepartz A. (2007), High-Resolution Structure of a β -Peptide Bundle. *J Am Chem Soc*, 129: 1532-1533.
103. Bodenhausen G, Ruben DJ. (1980), Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chem Phys Lett*, 69: 185-189.

104. Kay L, Keifer P, Saarinen T. (1992), Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J Am Chem Soc*, 114: 10663-10665.
105. Palmer AG, Cavanagh J, Wright PE, Rance M. (1991), Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy. *J Magn Reson*, 93: 151-170.
106. Schleucher J, Schwendinger M Fau - Sattler M, Sattler M Fau - Schmidt P, Schmidt P Fau - Schedletsky O, Schedletsky O Fau - Glaser SJ, Glaser Sj Fau - Sorensen OW, Sorensen Ow Fau - Griesinger C, Griesinger C. (A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients.
107. van Zijl PC, Hurd RE. (2011), Gradient enhanced spectroscopy. *J Magn Reson*, 213: 474-476.
108. Castañar L, Parella T. Recent Advances in Small Molecule NMR: Improved HSQC and HSQMBC Experiments. In: Webb GA (szerk.), *Annual Reports on NMR Spectroscopy*. Academic Press, San Diego, 2015: 163-232.
109. Bax A, Summers MF. (1986), Proton and carbon-13 assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR. *J Am Chem Soc*, 108: 2093-2094.
110. Kogler H, Sørensen OW, Bodenhausen G, Ernst RR. (1983), Low-pass J filters. Suppression of neighbor peaks in heteronuclear relayed correlation spectra. *J Magn Reson*, 55: 157-163.
111. Akitt JW, Mann BE. *NMR and Chemistry - An introduction to modern NMR spectroscopy*. CRC Press, London, 2000: 275-279.
112. Lindon JC. Multidimensional NMR Spectroscopy. In: (szerk.), *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier, Amsterdam, 2016: 135-147.
113. Harwood JS, Mo H. Homonuclear Correlation Experiments. In: Harwood JS, Mo H (szerk.), *Practical NMR Spectroscopy Laboratory Guide*. Academic Press, Boston, 2016: 51-60.
114. Bax A, Davis DG. (1985), MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. *J Magn Reson*, 65: 355-360.

115. Kessler H, Oschkinat H, Griesinger C, Bermel W. (1986), Transformation of homonuclear two-dimensional NMR techniques into one-dimensional techniques using Gaussian pulses. *J Magn Reson*, 70: 106-133.
116. Nakanishi K. One-dimensional and two- dimensional NMR Spectra by modern pulse techniques. 2019: 169-178.
117. Tóth G, Balázs B. ¹H és ¹³C NMR Spektroszkópia. In: Tóth G, Balázs B (szerk.), Szerves vegyületek szerkezetfelderítése. Műegyetemi Kiadó, Budapest, 2007: 133-186.
118. Stott K, Keeler J, Van QN, Shaka AJ. (1997), One-Dimensional NOE Experiments Using Pulsed Field Gradients. *J Magn Reson*, 125: 302-324.
119. Stott K, Stonehouse J, Keeler J, Hwang T-L, Shaka AJ. (1995), Excitation Sculpting in High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Application to Selective NOE Experiments. *J Am Chem Soc*, 117: 4199-4200.
120. Stejskal EO, Tanner JE. (1965), Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. *J Chem Phys*, 42: 288-292.
121. Johnson CS. (1999), Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 34: 203-256.
122. Wu DH, Chen AD, Johnson CS. (1995), An Improved Diffusion-Ordered Spectroscopy Experiment Incorporating Bipolar-Gradient Pulses. *J Magn Reson*, 115: 260-264.
123. Claridge TDW. Diffusion NMR spectroscopy. In: Claridge TDW (szerk.), Tetrahedron Organic Chemistry Series. Elsevier, Amsterdam, 2009: 303-334.
124. Li D, Kagan G, Hopson R, Williard PG. (2009), Formula Weight Prediction by Internal Reference Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy (DOSY). *J Am Chem Soc*, 131: 5627-5634.
125. Smallcombe SH, Patt SL, Keifer PA. (1995), WET Solvent Suppression and Its Applications to LC NMR and High-Resolution NMR Spectroscopy. *J Magn Reson*, 117: 295-303.
126. Liu M, Mao X-a, Ye C, Huang H, Nicholson JK, Lindon JC. (1998), Improved WATERGATE Pulse Sequences for Solvent Suppression in NMR Spectroscopy. *J Magn Reson*, 132: 125-129.

127. Piotto M, Saudek V, Sklenar V. (1992), Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J Biomol NMR*, 2: 661-665.
128. Hwang TL, Shaka AJ. (1995), Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients. *J Magn Reson*, 112: 275-279.
129. Logan TM, Murali N, Wang G, Jolivet C. (1999), Application of a high-resolution superconducting NMR probe in natural product structure determination†. *Magn Reson Chem*, 37: 762-765.
130. Cicero DO, Barbato G, Bazzo R. (2001), Sensitivity Enhancement of a Two-Dimensional Experiment for the Measurement of Heteronuclear Long-Range Coupling Constants, by a New Scheme of Coherence Selection by Gradients. *J Magn Reson*, 148: 209-213.
131. Gaillet C, Lequart C, Debeire P, Nuzillard J-M. (1999), Band-Selective HSQC and HMBC Experiments Using Excitation Sculpting and PFGSE. *J Magn Reson*, 139: 454-459.
132. Delaglio F, Walker GS, Farley KA, Sharma R, Hoch JC, Arbogast LW, Brinson RG, Marino JP. (2017), Non-Uniform Sampling for All: More NMR Spectral Quality, Less Measurement Time. *Am Pharmaceut Rev*, 20: 339681.
133. Yao H, Wynendaele E, Xu X, Kosgei A, De Spiegeleer B. (2018), Circular dichroism in functional quality evaluation of medicines. *J Pharm Biomed Anal*, 147: 50-64.
134. Kelly SM, Jess TJ, Price NC. (2005), How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta*, 1751: 119-139.
135. Sklenar V, Piotto M, Leppik R, Saudek V. (1993), Gradient-Tailored Water Suppression for ^1H - ^{15}N HSQC Experiments Optimized to Retain Full Sensitivity. *J Magn Reson*, 102: 241-245.
136. Duddeck H, Dietrich W, Tóth G. Structure elucidation by modern NMR. Springer-Steinkopff, Darmstadt, 1998: 149-157.
137. Pretsch E, Tóth G, Munk ME, Badertscher M. Computer-aided Structure Elucidation. Spectra Interpretation and Structure Generation. Wiley-VCH, Weinheim, 2002: 102.

138. Pretsch E, Clerc T, Seibl J, Simon W. Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 1990: 212.
139. Nekkaa I, Bogdán D, Gáti T, Béni S, Juhász T, Palkó M, Paragi G, Tóth GK, Fülöp F, Mándity IM. (2019), Flow-chemistry enabled efficient synthesis of β -peptides: backbone topology vs. helix formation. Chem Commun, 55: 3061-3064.

10. Saját publikációk jegyzéke

I. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények

1. **D. Bogdán**, R. Haessner, M. Vágvolgyi, D. Passarella, A. Hunyadi, T. Gáti, G. Tóth. Stereochemistry and complete ^1H and ^{13}C NMR signal assignment of C-20-oxime derivatives of posterone 2,3-acetonide in solution state, *Magn. Reson. Chem.* 56 (2018) 859-866, DOI: 10.1002/mrc.4750
IF: 1,78
2. I. Nekkaa¹, **D. Bogdán**¹, T. Gáti, Sz. Béni, T. Juhász, M. Palkó, G. Paragi, G. K. Tóth, F. Fülöp, I. M. Mándity. Flow-chemistry enabled efficient synthesis of β -peptides: backbone topology vs. helix formation, *ChemComm.* 55 (2019) 3061-3064, DOI: 10.1039/C8CC10147G
IF: 6,29
¹: Megosztott elsőszerszőség

II. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények

1. M. Atia, **D. Bogdán**, M. Brügger, N. Haider, P. Mátyus. Remarkable regioselectivities in the course of the synthesis of two new Luotonin A derivatives, *Tetrahedron* 73 (2017) 3231-3239
2. Á. Horváth, A. Menghis, B. Botz, É. Borbély, Á. Kemény, V. Tékus, J. Zs. Csepregi, A. Mócsai, T. Juhász, R. Zákány, **D. Bogdán**, P. Mátyus, J. Keeble, E. Pintér & Zs. Helyes. Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of the Novel Semicarbazide-Sensitive Amine-Oxidase Inhibitor SzV-1287 in Chronic Arthritis Models of the Mouse, *Nature Scientific Reports* 7 (2017) 39863
3. R. Meleddu, S. Distinto, A. Corona, G. Bianco, V. Cannas, F. Esposito, A. Artese, S. Alcaro, P. Matyus, **D. Bogdan**, F. Cottiglia, E. Tramontano, E. Maccioni. (3Z)-3-(2-[4-(aryl)-1,3-thiazol-2-yl]hydrazin-1-ylidene)-2,3-dihydro-1H-indol-2-one derivatives as dual inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase, *Eur. J. Med. Chem.* 93 (2015) 452-460

11. Köszönetnyilvánítás

Elsőként fejezem ki köszönetemet témavezetőmnek, *Dr. Mándity Istvánnak* PhD-munkám feltételeinek biztosításáért és szakmai támogatásáért.

Szeretném köszönetemet kifejezni konzulensemnek, *Dr. Gáti Tamásnak*, aki bevezetett az NMR spektroszkópia világába és hasznos megbeszélésekkel segítette munkámat.

Köszönettel tartozom *Prof. Dr. Tóth Gábornak*, akivel a szkvalén-konjugátumok témakörében dolgoztunk együtt, hogy mindig aktívan és készségesen előremozdította az eredmények megszületését.

Köszönöm a *Servier Kutatóintézetnek*, a *Richter Gedeon NyRt. Szerkezetkutatási osztályának* és a *Technische Universität Münchennek*, hogy biztosították az NMR spektrométerük használatát a vegyületek vizsgálatához.

Köszönetet mondok a *Semmelweis Egyetem Szerves Vegytani Intézetének*, ahol munkámat végeztem.

Köszönettel tartozom *Prof. Dr. Norbert Haidernek*, az *Universität Wien*, *Department für Arzneistoffsyntese* professzorának, hogy négy hónapos szintetikus kutatómunkát végezhettem a csoportjában és sokat tanulhattam tőle. Ezen időszakra köszönöm az *Oszták-Magyar Akció Alapítvány*, az *OeAd* és a *Bundesministerium für Wissenschaft, Forschung und Wirtschaft* Ernst Mach ösztöndíját.

Az *Emberi Erőforrások Minisztériumának* és az *Új Nemzeti Kiválóság Programnak* köszönöm a szkvalén-konjugátumok témakörében végzett tágabb vizsgálatok támogatását és doktorjelölti ösztöndíjamat.

Minden társszerzőmnek köszönöm a közös munkát és a vegyületek rendelkezésre bocsátását.

Köszönetet mondok *Prof. Dr. Mátyus Péternek*, korábbi témavezetőmnek, hogy a közös munka során sok, a későbbiekben is értékes tapasztalattal gazdagodhattam.

Szeretnék köszönetet mondani *Prof. Dr. Zelkó Románának* és *Prof. Dr. Noszál Bélának*, a *Gyógyszertudományok Doktori Iskola* jelenlegi és korábbi vezetőjének, és *Dr. Antal István* programvezetőnek, hogy követték PhD-munkám haladását és támogatták sikeres befejezését.

Hálasan fejezem ki köszönetemet *családomnak*, akik biztosítottak támogatásukról tanulmányaim és PhD-munkám során.